

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA



Tesis Doctoral

**ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE FACTORES
NUTRICIONALES Y BIOQUÍMICOS SOBRE LA
EDAD DE LA MENARQUIA**

Teresa Gavela Pérez

2015



La **Doctora Carmen Garcés Segura**, doctora en Ciencias Químicas y directora del laboratorio de Lípidos del IIS-Fundación Jiménez Díaz y el **Profesor Leandro Soriano Guillén**, profesor asociado del Departamento de Pediatría de la Universidad Autónoma de Madrid, acreditado a profesor titular, Secretario del Departamento de Pediatría y Jefe Asociado del Servicio de Pediatría de la Fundación Jiménez Díaz

INFORMAN:

Que **Teresa Gavela Pérez**, Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid y especialista en Pediatría y sus Áreas específicas ha realizado bajo su dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral: “**Análisis de la influencia de factores nutricionales y bioquímicos sobre la edad de la menarquia**”.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conforme con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente en Madrid, a veinte de Mayo del dos mil quince.

Dra. Carmen Garcés Segura

Prof. Leandro Soriano Guillén

A mis padres.

A Alberto y a mis hijas.

A todos los que me han apoyado en estos años.

Después de estos años con mis altibajos puedo palpar el fruto del trabajo. No me gustaría que esto fuera un fin, sino la meta de una primera etapa. En este tiempo son muchas las personas que me han acompañado y apoyado, y muchos los recuerdos de personas que en momentos anteriores de mi vida me animaron a seguir este camino. A todas ellas les doy un inmenso GRACIAS.

Especialmente quiero agradecer a mis directores de tesis: Leandro y Carmen, ejemplos de trabajo, sabiduría y dedicación.

Gracias Leandro, amigo, jefe y maestro en la pediatría. Gracias por hacerme ver nuestra profesión desde un punto de vista más integral. Gracias por tu trabajo del día a día. Gracias por tus consejos y por contagiarme parte de tu pasión por la investigación. Gracias por depositar tu confianza en mí, por tu paciencia y por tu comprensión. Te debo mucho de lo que soy profesionalmente.

Gracias Carmen, amiga, confidente, compañera de alegrías y de penas. Gracias por abrirme de par en par las puertas del laboratorio, donde está tu vida y donde yo me siento como en casa. Gracias por tener fuerza para continuar con los proyectos que el Profesor Manuel de Oya inició, y gracias por permitirme ser parte de ellos. Gracias por enseñarme tantas cosas de la vida y de la ciencia.

Gracias a todos los niños que aceptaron participar en el Estudio Cuatro Provincias.

También quiero agradecer de forma especial a mis padres, Ramón y Conchi. Gracias por la educación que me habéis dado, gracias por vuestro ejemplo y por vuestro trabajo. Ramón, gracias por ser tan insistente, por no decir òpesadoö, en animarme a hacer la tesis y en pincharme continuamente para no parar. Mami, gracias por tu preocupación continua por mí, por tu ayuda logística fundamental para mis tardes de ausencia en casa. Gracias por cuidar tan bien de mis niñas. Gracias a mis abuelos Manolo y Dora, por lo que lucharon por

los estudios y la educación de sus hijos a pesar de las dificultades vividas. Gracias a mis abuelos del cielo, Antonia y Pedro, gracias porque de vuestra casa tengo muchos de los mejores recuerdos de mi infancia, gracias por ofrecerme ese rincón sólo para mí.

Gracias a Alber Titoö. Gracias por tu amor, por tu paciencia en mis momentos irascibles, no pocos en este camino. Gracias por permitirme aprovechar esta oportunidad y por tu apoyo continuo. Gracias por nuestra vida en común. Gracias a mis hijas, Irene e Isabel, princesas de mi vida, por recibirme siempre con una sonrisa, por quererme, por cuidarme y por respetar mis momentos. Os quiero mucho y sois el motor de mi vida.

Gracias a mis hermanos, Daniel, Isabel y Antonio. Gracias por nuestra infancia compartida. Aunque siempre pensé que no me orientasteis bien en la elección de mi carrera, en el fondo os lo tengo que agradecer. Gracias a todas vuestras familias, a Ruth, Maite y Miguel Ángel. Todos sois grandes profesionales y muy valorados en vuestro trabajo. Gracias por el modelo. Gracias a todos mis sobrinos, desde el pequeño Alvarito hasta el mayorcísimo Marcos, pasando por María, Miguel, Claudia, Ana y Daniel. Gracias por obligarme a pensar en otra cosa en vuestra presencia.

Gracias a Raquel, Irene y Patricia por vuestra amistad incondicional. Gracias por haber confiado en mí en tantos momentos. Perdón por mi ausencia de los últimos meses en el que tantas cosas nos han pasado. Os quiero mucho.

Gracias a Locos hacia Nínive, gracias por continuar confiando en mí como sembradora. Gracias a cada uno de vosotros por vuestro testimonio.

Gracias a mis amigos Jaime y Alberto, maestros de tantísimas cosasí Gracias a Javi, por sus sonrisas. Gracias a Laura y a Dani por su apoyo incondicional y sus ánimos. Gracias a todos por confiar en mí.

Gracias especiales a Héctor, Paula, Daniel, María, Emma, Pablo y Enrique. Gracias por vuestras sonrisas y por los momentos de evasión con vosotros. Aunque no os haya visto mucho en este tiempo, habéis ocupado siempre parte de mi mente.

Gracias a mis compañeros de trabajo. Gracias por entender mi labor y por mostrarme vuestro apoyo para la realización de la tesis. Especialmente quiero agradecer a Paula, compañera desde el inicio de mi andanza como pediatra, amiga y confidente en la FJD. Gracias a Pepe, por nuestras conversaciones. Gracias a Amalia y Vevi, por sus consejos y su ejemplo en el trabajo. Gracias Nieves, jefa, por tu apoyo. Gracias a los neuropediatras por esos desayunos tan divertidos. Gracias a todo el grupo de enfermeras y auxiliares, de forma especial a Isabel, Rosa, Mari Jose y Nines por lo bien que me cuidan. Gracias a todos, de verdad.

Gracias a Lorena y a Pilar, compañeras del laboratorio. Gracias por enseñarme las técnicas. Gracias por vuestra ayuda, por vuestra paciencia y por comprender mis visitas fugaces y momentos de ausencia. Gracias a Rosa y Marina, compañeras del laboratorio de neurología, gracias por vuestra sonrisa a través de la cristalera y por vuestros comentarios animándome a seguir.

Gracias a Esther Ramiro, por su ayuda y sus explicaciones en los procesos administrativos de la tesis.

Gracias a Dios por tener a tanta gente a la que agradecer la consecución de este trabajo.

ABREVIATURAS

AgRP: *agouti-related-peptide*

AMPK: *mitogen activated protein kinases*

ANOVA: análisis de la varianza

ARC: núcleo arcuato

AVPV: núcleo anteroventral periventricular

CART: transcriptor relacionado con cocaína-anfetamina

DE: desviación estándar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

ERK: *extracellular signal-regulated kinases*

FSH: hormona folículo estimulante

GH: hormona de crecimiento

GHRH: hormona liberadora de la hormona de crecimiento

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

GPR54: receptor de kipeptina

GWAS: estudios de asociación de genoma completo

HHG: hipotálamo-hipófiso-gonadal

IGF1: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

IMC: índice de masa corporal

IOTF: *International Obesity Task Force*

IP: índice ponderal

IRMA: inmunorradiometría

LH: hormona luteinizante

JAK: Janus kinasa

KISS1: gen de kisseptina

KISS1R: gen del receptor de kisseptina

LEP: gen de leptina

LEPR: gen del receptor de leptina

mTOR: diana de rapamicina en mamíferos

NKA: neuroquinina A

NKB: neuroquinina B

NKBR: receptor de neuroquinina B

NP: normopeso

NPY: neuropéptido Y

OB: obesidad

POMC: proopiomelanocortina

PRN: peso de recién nacido

RFRP: péptido relacionado con RFamida

rpm: revoluciones por minuto

RPTP : receptor tipo de la proteína tirosín fosfatasa

SDS: *standard deviation score*; z-score

SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales

SOP: síndrome de ovario poliquístico

SP: sobrepeso

STAT: *signalling transducer and activator of transcripción*

SynCAM1: molécula de adhesión celular tipo 1

TAC3: gen de neuroquinina B

TAC3R: gen receptor de neuroquinina B

TGF : factor de crecimiento transformador tipo

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
1. Definición de pubertad	3
2. Cambios físicos durante la pubertad	3
3. Edad de la menarquia y tiempo de desarrollo puberal	6
3.1. Tendencia secular en la edad de inicio del desarrollo puberal y en la edad de la menarquia	6
3.2. Diferencias entre el tiempo de maduración puberal y la edad de la menarquia	9
3.3. Estimación de la edad de la menarquia	10
4. Fisiología de la pubertad: neuroregulación y control metabólico	11
4.1. Eje hipotálamo-hipófiso-gonadal	11
4.2. Regulación de la generación de pulsos de GnRH	14
4.3. Familia de kipeptinas	17
<i>Papel de co-moléculas de kipeptina en el desarrollo de la pubertad</i>	19
4.4. Mecanismos epigenéticos en el control de la pubertad	20
4.5. Bases generales del control metabólico de la pubertad	22
4.6. Datos antropométricos y tiempo de desarrollo puberal	24
<i>Menarquia y datos antropométricos a lo largo de la edad pediátrica</i>	24
<i>Menarquia y datos antropométricos al nacimiento</i>	25
4.7. Señales metabólicas desde el tejido graso. Papel de las adipocinas en la regulación de la pubertad	26
4.7.1. Leptina	27
Papel de la leptina en la neuroregulación de la pubertad y su relación con la familia de kipeptinas	28
Leptina y desarrollo puberal en humanos	31
<i>Evidencia de afectación del desarrollo puberal en modelos de malnutrición y su relación con los niveles de leptina</i>	32
<i>Evidencia de afectación del desarrollo puberal en modelos de sobrenutrición y su relación con los niveles de leptina</i>	34

4.7.2. Adiponectina	34
Relación de los niveles de adiponectina con la pubertad	35
Papel de la adiponectina sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal	36
4.8.. Señales metabólicas desde el sistema digestivo	37
4.8.1. Grelina	37
Control de la homeostasis energética y regulación del apetito	38
Grelina y neuroregulación de la pubertad	38
Niveles circulantes de grelina	40
4.8.2. Insulina	42
Acciones de la insulina sobre el eje gonadotropo	42
HIPOTESIS	47
OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. Selección de la muestra	57
1.1. Población	57
1.2. Procedimiento de muestreo	58
2. Obtención y procesamiento de la muestra para estudio bioquímico	58
3. Edad de la menarquia	60
4. Datos antropométricos	60
5. Determinaciones bioquímicas	63
5.1. Determinación de leptina	64
5.2. Determinación de adiponectina	64
5.3. Determinación de insulina	65
5.4. Determinación de grelina	65
6. Análisis estadístico	67
7. Limitaciones	69

RESULTADOS	71
1. Descripción de la muestra	73
1.1. Parámetros antropométricos al nacimiento	74
1.2. Parámetros antropométricos en la infancia y en la adolescencia	75
1.3. Niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina a ambas edades	77
2. Edad de la menarquia	78
3. Datos antropométricos y edad de la menarquia	80
3.1. Datos perinatales y edad de la menarquia	80
3.2. Datos antropométricos a los 6-8 años y edad de la menarquia	81
3.3. Datos antropométricos a los 13-16 años y edad de la menarquia	82
3.4. Evolución del IMC desde la edad prepuberal a la adolescencia y edad de la menarquia	85
3.5. Evolución de los datos antropométricos desde el nacimiento a la edad prepuberal y a la adolescencia y edad de la menarquia	86
4. Relación de las variables bioquímicas con los datos antropométricos	88
4.1 Edad prepuberal	88
4.2. Adolescencia	88
5. Variables bioquímicas y edad de la menarquia	90
5.1. Niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina a los 6-8 años y edad de la menarquia	90
5.2. Variación de los niveles de las variables bioquímicas entre primer y segundo corte y edad de la menarquia	93
5.3. Análisis de regresión	94
6. Edad de la menarquia y niveles de leptina en relación con variables antropométricas	95
6.1. Terciles de leptina por categorías de peso y relación con la edad de la menarquia	95
6.2. Ratio leptina/IMC en niñas prepuberales y relación con la edad de la menarquia	96
6.3. Variación de categoría de peso(normopeso/sobrepeso) entre primer y segundo corte y niveles de leptina	97

DISCUSIÓN	99
Datos antropométricos y edad de la menarquia	104
Péptidos derivados de tejidos adiposo y gastrointestinal y edad de la menarquia	110
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ANEXOS	143
Anexo I. Informe del Comité Ético del Instituto de Investigación Clínica	145
Anexo II. Publicaciones derivadas del estudio hasta la fecha	147
Anexo III. Artículos publicados a lo largo del desarrollo de esta tesis	173

ÍNCICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de IMC expresados como media y desviaciones estándar para las edades de las niñas del estudio según las tablas de <i>Carrascosa</i> 2008.	61
Tabla 2. Puntos de corte internacionales de IMC propuestos por <i>Cole</i> y <i>colaboradores</i> para las edades de las niñas de este estudio.	62
Tabla 3. Percentiles de cintura para niñas europeas.	63
Tabla 4. Datos antropométricos al nacimiento [media (intervalo de confianza al 95%)].	74
Tabla 5. Datos antropométricos de las niñas en la edad prepuberal y en la adolescencia [media (intervalo de confianza al 95%)].	75
Tabla 6. Perímetro de cintura (valor absoluto y z-score), perímetro de cadera y masa grasa (cantidad y porcentaje) de las 195 niñas en la adolescencia [media (IC al 95%)].	76
Tabla 7. Niveles de las variables bioquímicas de las niñas del estudio en la edad prepuberal y a los 13-16 años [media (intervalo de confianza al 95%)]	77
Tabla 8. Edad de la menarquia según la provincia de origen de todas las niñas del segundo corte [media (intervalo de confianza al 95%)]	78
Tabla 9. Número y frecuencia de niñas en cada uno de los grupos de edad de la menarquia considerados para el análisis.	79
Tabla 10. Porcentaje (número) de niñas de Madrid, Orense, Cádiz y Murcia en los diferentes grupos de edad de la menarquia.	79
Tabla 11. Correlación de Spearman de los datos antropométricos al nacimiento con la edad de la menarquia (n=166 niñas).	80
Tabla 12. Análisis de la edad de la menarquia según índice ponderal (IP) al nacimiento.	81
Tabla 13. Correlación de Spearman de la edad de la menarquia con los datos antropométricos a los 6-8 años.	81
Tabla 14. Variables antropométricas en niñas prepuberales según los grupos de edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)]	82
Tabla 15. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en función de los grupos de categoría de peso a los 6-8 años.	82
Tabla 16. Correlación de Spearman de los datos antropométricos a los 13-16 años con la edad de la menarquia.	83

Tabla 17. Variables antropométricas en niñas del segundo corte según los grupos de edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)]	84
Tabla 18. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en función de la categoría de peso a la edad de 13-16 años.	85
Tabla 19. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas clasificadas en función del cambio de categoría de peso entre ambas edades.	86
Tabla 20. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas en función del cambio de categoría de IP y de peso entre el nacimiento y los 6-8 años.	87
Tabla 21. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas en función del cambio de categoría de IP y de peso entre el nacimiento y los 13-16 años.	87
Tabla 22. Correlación de Spearman entre el IMC y el z-score del IMC y las variables bioquímicas en la edad prepuberal.	88
Tabla 23. Correlación entre el IMC y el z-Score del IMC, la cintura y la masa grasa con las variables bioquímicas en la adolescencia.	89
Tabla 24. Correlación de Pearson entre la masa grasa y el peso, la talla, el IMC, el z-score del IMC, la cintura, el z-score de la cintura y la cadera a la edad de 13-16 años.	89
Tabla 25. Correlación de Spearman de la edad de la menarquia con los niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina en niñas prepuberales y correlación parcial de los mismos tras ajustar por el IMC a esta edad.	90
Tabla 26. Correlación de Spearman de edad de la menarquia con los datos antropométricos a los 6-8 años y correlación parcial de los mismos tras ajustar por los niveles de leptina.	91
Tabla 27. Niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina (media e intervalo de confianza al 95%) en niñas a los 6-8 años en función del grupo de edad de la menarquia.	92
Tabla 28. Niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina (media e intervalo de confianza al 95%) en niñas prepuberales (6-8 años) con normopeso en función del grupo de edad de la menarquia (EM).	92
Tabla 29. Niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas prepuberales (6-8 años) con sobrepeso y obesidad (SP+OB) en función de la categoría de edad de la menarquia (EM)	93
Tabla 30. Correlación de la edad de la menarquia con las variaciones de los niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina entre ambas edades.	94

Tabla 31. Edad de la menarquia y niveles de leptina en niñas prepuberales con normopeso en función de terciles de leptina.	96
Tabla 32. Edad de la menarquia y niveles de leptina en niñas prepuberales con exceso de peso (sobrepeso y obesidad) en función de terciles de leptina.	96
Tabla 33. Valores del ratio leptina/IMC [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas prepuberales (6-8 años) en función de la categoría de edad de la menarquia (EM)	97
Tabla 34. Edad de la menarquia, IMC y leptina en época prepuberal, variación del IMC y de leptina (media [intervalo de confianza al 95%]) en función de los cambios de categoría de peso entre los 6-8 años y los 13-16 años.	98
Tabla 35. Estudios en población española que estudian la edad de la menarquia.	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios del desarrollo puberal en niñas.	5
Figura 2. Marcadores del inicio de la pubertad. Picos de LH.	13
Figura 3. Vista general de la cadena de genes que operan a nivel neuronal y glial envueltas en la neuroregulación de la pubertad en mamíferos.	15
Figura 4. Esquema representativo de redes nodales de genes distribuidos de forma jerárquica, con un centro de actividades (hubs), que participan en la neuroregulación de la pubertad	17
Figura 5. Esquema de los conocimientos existentes sobre la represión transcripcional en la pubertad.	21
Figura 6. Representación esquemática de la relación entre hormonas del sistema gastrointestinal (verde) y hormonas del tejido adiposo (amarillo) con el eje reproductor.	23
Figura 7. Número de niños participantes en el estudio Cuatro Provincias y número de niñas de las que disponemos de la edad de la menarquia (EM).	73
Figura 8. Prevalencia de normopeso, sobrepeso y obesidad en nuestra población.	76

Introducción

1. DEFINICIÓN DE PUBERTAD

La pubertad es el periodo de transición del desarrollo en el que tienen lugar los cambios fisiológicos, morfológicos y psicológicos que marcan la diferencia entre la infancia y la edad adulta. Se trata de un proceso madurativo de límites muy imprecisos que, en condiciones normales, se inicia con la aparición de los caracteres sexuales secundarios y finaliza cuando se ha alcanzado la talla adulta, la maduración sexual completa y la capacidad reproductora¹.

En las niñas, se considera una pubertad normal, en cuanto a tiempo de desarrollo, aquella en la que la aparición de los caracteres sexuales secundarios acontece entre los 8 y los 13 años. Este concepto obedece a criterios puramente estadísticos, es decir, si la aparición de estos rasgos ocurre dentro del intervalo de $\pm 2,5$ DE para la edad y población de referencia^{2,3}.

2. CAMBIOS FÍSICOS DURANTE LA PUBERTAD

La secuencia en los cambios somáticos propios de la pubertad es progresiva, existiendo una variación interindividual, tanto en el comienzo como en el ritmo al que se desarrolla la pubertad, en función de los componentes genéticos y ambientales⁴⁻⁶.

Hay dos fenómenos claramente diferenciados en el desarrollo puberal en la mujer. Por un lado, la **gonadarquia**, proceso que implica el desarrollo de las mamas y de sus glándulas apocrinas modificadas que está, en principio, sujeta al control de los estrógenos segregados por los ovarios; y, por otro, la **adrenarquia**, fenómeno caracterizado por el crecimiento del vello púbico y axilar, que está principalmente regulado por los andrógenos secretados por la corteza suprarrenal^{5,6}.

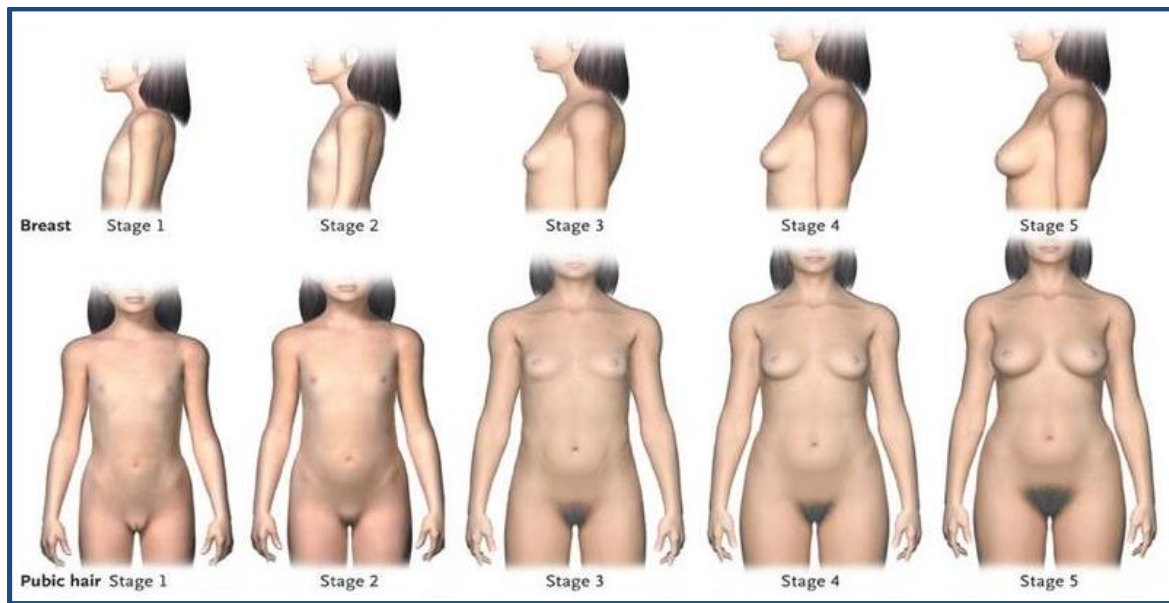
En el desarrollo normal, las glándulas suprarrenales maduran y secretan andrógenos varios años antes del comienzo de la maduración gonadal. Los andrógenos liberados por las glándulas suprarrenales, además de estimular el crecimiento del vello corporal y pubiano, aceleran la edad ósea y favorecen la modificación de la conducta y, una vez convertidos en estrógenos en la periferia, también estimulan el crecimiento de la glándula mamaria.

El tejido glandular y conjuntivo de la glándula mamaria empieza a desarrollarse al principio de la maduración puberal, denominándose telarquía, lo que supone la primera manifestación externa de la pubertad y acontece aproximadamente a una edad ósea de 11 años. Los lóbulos mamarios, que se componen de pequeños ductos y tejido celular conjuntivo, evolucionan y se hacen más pronunciados en la pubertad, aunque la proliferación paralela del tejido graso y conjuntivo es responsable del 80% del volumen de la mama de la mujer no lactante. Por ello, en no pocas ocasiones, es difícil distinguir la adipomastia de la verdadera telarquía, incluso por palpación⁴⁻⁶.

Para valorar el grado de desarrollo puberal, en la práctica clínica habitual, se siguen utilizando los estadios de *Tanner*, que fueron definidos en la década de los sesenta⁷. Esta clasificación diferencia cinco estadios distintos de desarrollo puberal, basándose en la presencia y morfología de la telarquía y de la pubarquía ([figura 1](#)), de forma que el estadio Tanner I corresponde al estadio infantil y el estadio Tanner V al adulto.

La menarquía o primer ciclo menstrual, se produce aproximadamente dos años después del inicio del desarrollo puberal, coincidiendo con el estadio IV de Tanner. No obstante, es preciso reseñar que, alrededor de una cuarta parte de las niñas pueden presentar la menarquía en el estadio III de Tanner.

Figura 1. Estadios del desarrollo puberal en niñas (tomado de referencia 2)



Durante el periodo puberal se objetiva una aceleración de la velocidad de crecimiento fruto de la acción sinérgica de la hormona de crecimiento (GH) y de los esteroides sexuales. La máxima aceleración del crecimiento se objetiva en el estadio puberal Tanner III. Posteriormente, tras la menarquia, se objetiva una desaceleración paulatina de la velocidad de crecimiento. Así, de forma global, desde el inicio de la pubertad hasta alcanzar la talla adulta, las niñas suelen crecer entre 20 y 25 cm⁴⁻⁶.

Por otro lado, a lo largo de la pubertad se producen los cambios más importantes en la composición corporal, incluyendo modificaciones en las proporciones relativas de agua, músculo, hueso y grasa corporal. De esta forma, bajo la influencia de los esteroides gonadales y de la GH, se produce un incremento del contenido mineral óseo, de la masa muscular y del depósito de grasa. En las niñas, la cantidad de grasa corporal llega a triplicarse a lo largo de la pubertad⁸.

3. EDAD DE LA MENARQUIA Y TIEMPO DE DESARROLLO PUBERAL

La menarquia es el primer ciclo menstrual en la mujer y acontece, como hemos comentado previamente, en el estadio IV del desarrollo puberal^{5,6}. Es un punto clave en la pubertad, y es utilizado en muchos estudios como marcador de adecuado desarrollo puberal en las niñas. La menarquia es un acontecimiento único en la vida de una mujer, por lo que obtener información relativa a este evento no es difícil.

En España, se estima que la edad de la menarquia acontece aproximadamente entre los 12 y 12,5 años. No obstante, son pocos los estudios realizados con el objetivo principal de analizar la edad de la menarquia y, en general, se han restringido a niñas de determinadas áreas geográficas: catalanas^{9,10}, vascas¹¹ y madrileñas¹²⁻¹⁴.

Actualmente se piensa que la edad de la menarquia está determinada tanto por factores ambientales como genéticos, atribuyéndose a factores genéticos entre el 53 y el 74% de la variación en la edad de la menarquia¹⁵. Sin embargo, el adelanto en la edad de la menarquia en las últimas décadas ha puesto de manifiesto la importancia de la influencia de factores ambientales.

3.1. TENDENCIA SECULAR EN LA EDAD DE INICIO DEL DESARROLLO PUBERAL Y EN LA EDAD DE LA MENARQUIA

Varios estudios europeos, sobre todo de los países nórdicos Dinamarca, Finlandia y Noruega, documentaron que la edad de la menarquia había descendido de 16-17 años en el siglo XIX a 13 años a mediados del siglo XX¹⁶. En la misma línea, en Estados Unidos también se ha documentado esta tendencia con un descenso en la edad de la menarquia de 14,75 a 13 años comparando entre los siglos XIX y XX¹⁷, descenso que parece haberse

frenado en las últimas décadas¹⁸. En mujeres coreanas también se ha visto un descenso en la edad de la menarquia entre principios y finales del siglo XX, desde una media de 16,9 años a una de 13,8 años¹⁹.

No sólo la edad de la menarquia se ha adelantado desde el pasado siglo, también parece existir un adelanto, aún mayor, en la edad a la que se inicia la telarquia, de forma que parece prolongarse el tiempo que dura el desarrollo puberal. En este sentido, a finales de la década de los 90 en Estados Unidos, se puso en alerta a la comunidad internacional y se llegó a cuestionar la definición de pubertad precoz tras la publicación de un estudio transversal, que objetivaba unos tiempos de inicio de desarrollo puberal muy precoces respecto a investigaciones anteriores, sobre todo en mujeres de raza negra²⁰. No obstante, este estudio de *Herman-Giddens* presentaba errores metodológicos: el principal de ellos fue la estimación del estadio puberal, que se realizó valorando la presencia de telarquia mediante inspección y no por palpación, de forma que no se pudo distinguir entre los casos de verdadera telarquia y los de adipomastia, fenómeno cada vez más prevalente dada la epidemia de obesidad infantojuvenil. En este mismo estudio también se interrogó sobre la edad de la menarquia, mostrando un mínimo adelanto con respecto a estudios de décadas anteriores, sin llegar a la diferencia de tiempo tan significativa objetivada al analizar la aparición de telarquia. Continuando con esta línea de investigación, estudios epidemiológicos realizados en niñas danesas también muestran un adelanto en la aparición de telarquia que no se acompaña de cambios hormonales sugerentes de activación central de la pubertad ni de un adelanto en la edad de menarquia²¹. Como consecuencia, el criterio más unánimemente aceptado por la comunidad científica internacional para considerar pubertad precoz en las niñas continúa siendo la aparición de progresión de caracteres sexuales secundarios junto aceleración del crecimiento y la madurez ósea antes de los 8 años.

Respecto a la tendencia secular de la edad de la menarquia en la población española hay pocos datos publicados, ya que la mayoría de los estudios han sido realizados en las tres últimas décadas. En nuestro conocimiento, solamente un estudio evalúa la edad de la menarquia de mujeres españolas de la primera mitad del siglo XX. Se trata de un estudio en población madrileña de niñas nacidas a partir de los años cuarenta, que mostraba en sus madres, la más antigua nacida en el año 1922, una edad de la menarquia media de 13,45 años (1,51 DE)¹². Este dato apunta a un descenso en la edad de la menarquia si lo comparamos con las edades de la menarquia medias de sus hijas, que fueron significativamente menores, mostrando una edad media de 13,03 años, o si lo comparamos con las medias de edad de la menarquia de otras niñas de la misma población estudiadas posteriormente, que fueron de 12,79 años (1,04 DE) en niñas nacidas en las décadas de los setenta y ochenta¹³ y de 12,17 años en niñas nacidas a finales del siglo XX (IC al 95% de 12,06-12,28)¹⁴. En este último estudio, *Soriano y col.* objetivaron que la edad de la menarquia de las niñas de su estudio también fue significativamente más temprana que la de sus madres (0,49 años). En cambio, en población catalana no se observó diferencias en la edad de la menarquia comparando adolescentes en la década de los ochenta y en la primera década del siglo XXI^{9,10}.

La teoría más aceptada en el momento actual para explicar la tendencia secular de adelanto en la edad de la menarquia, que ocurre en todas las razas de una forma paralela, ha sido, sin duda, la mejora de las condiciones nutricionales y del estado de salud tras la revolución industrial y tras conflictos bélicos²².

3.2. DIFERENCIAS ENTRE EL TIEMPO DE MADURACIÓN PUBERAL Y LA EDAD DE LA MENARQUIA

Una cuestión que se plantea actualmente es si existe una asociación estrecha y predecible entre el momento de inicio de la pubertad y la aparición de la menarquia, es decir, el tiempo global que dura el desarrollo puberal. Esta cuestión no es baladí, puesto que es un motivo de consulta relativamente frecuente el tratar de predecir la evolución de niñas que acaban de comenzar con telarquia, en términos de aparición de menarquia y pronóstico de talla adulta.

Así, datos provenientes de mujeres nacidas entre 1977 y 1979 mostraban una correlación moderada entre menarquia e inicio de la pubertad mientras que en estudios anteriores de mujeres nacidas entre 1920 y 1960 se había observado una correlación mayor²³. En esta misma línea, investigaciones posteriores llevadas a cabo en España, EEUU y Grecia^{20,24-26} muestran que niñas con maduraciones más tempranas presentan de forma compensatoria retraso en la progresión de la pubertad, lo que podría explicar la modesta correlación entre el inicio de la pubertad y la aparición del primer ciclo menstrual. Además, como se ha descrito anteriormente, estudios epidemiológicos en niñas danesas muestran cierto adelanto en la aparición de telarquia que no va asociado a aumentos en los niveles de estradiol ni de gonadotropinas, ni en adelantos en la consecución del primer ciclo menstrual, lo que sugiere la acción de un mecanismo gonadotropín independiente que puede estar relacionado con la nutrición, el ambiente y con la mayor biodisponibilidad y/o sensibilidad a los estrógenos circulantes²¹. Aunque estos hallazgos han de corroborarse con estudios multicéntricos en los que participen distintos países, parece que el intervalo entre la telarquia y menarquia se prolonga, lo que habría que tener presente a la hora de emitir predicciones sobre la evolución de la pubertad. En este mismo sentido y en relación a uno

de los ítems del desarrollo que más preocupa a los padres y a las adolescentes: el crecimiento, estudios muestran que las maduraciones puberales más tempranas en niñas están asociadas con una mayor ganancia de talla a lo largo de la pubertad, determinada por mayores picos de velocidad de crecimiento en la etapa puberal²⁶. Así, un estudio español mostró que no había diferencia de talla final alcanzada entre niñas con edades de desarrollo puberal distintas, pero que las que maduraban antes tenían picos de velocidad de crecimiento mayores²⁷. Ambos estudios señalan que, cuando se quieran analizar datos antropométricos en estas edades y se quieren comparar con estándares de normalidad, habría que buscar tablas de referencia para cada grupo de edad en función del tiempo de maduración^{26,27}.

3.3. ESTIMACIÓN DE LA EDAD DE LA MENARQUIA

A nuestro entender, existen tres métodos para evaluar la edad de la menarquia. El primero es el **método *statu quo* o método transversal**, en el que se obtiene este dato preguntando a los padres o a las niñas el estado actual de su desarrollo puberal, para lo que se requiere un tamaño muestral grande y un amplio margen de edad, de al menos entre los 8 y 16 años. El segundo es el **método retrospectivo de memoria**, en el que los datos se obtienen preguntando a niñas o a sus padres la información, de forma que cuanto más cercana a la edad de su menarquia se haga la pregunta más válido es este método; en este método deben incluirse niñas de edades en las que en condiciones normales ya se ha tenido el primer ciclo menstrual. Por último, está el **método prospectivo**, que es el más seguro pero también el más costoso, ya que implica el seguir a niñas desde edades precoces (7-8 años), con controles cada 3-6 meses, evaluando los distintos estadios del desarrollo puberal y preguntando en cada visita acerca de la primera menstruación²⁸.

4. FISIOLÓGÍA DE LA PUBERTAD: NEURORREGULACIÓN Y CONTROL METABÓLICO

El inicio de la pubertad es el resultado final de la interacción entre importantes determinantes genéticos y un gran número de factores reguladores que incluyen diferentes elementos endógenos y señales ambientales, como la disponibilidad de nutrientes, los disruptores endocrinos ambientales y los ciclos de luz y oscuridad. Estas interacciones se inician en etapas tempranas del desarrollo, por lo que la pubertad puede considerarse el punto final de un proceso madurativo constituido por las interacciones dinámicas de genes y ambiente. Así, como se ha comentado previamente y como muestran estudios familiares, se estima que entre el 60-80% de la variabilidad en la edad de la menarquia dependería de factores hereditarios²⁹, por lo que factores ambientales jugarían un papel importante sobre la edad de la menarquia, explicando hasta un 40% de su variabilidad.

Desde una perspectiva neurobiológica, ya desde hace dos décadas, se ha propuesto que el fenómeno final que pone en marcha la pubertad es el aumento en el número y en la amplitud de los picos de secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte de las neuronas hipotálamicas productoras de GnRH³⁰.

4.1. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL

El inicio de la pubertad es un fenómeno tremendamente complejo del que se derivan una serie de cambios madurativos, que se manifiestan de una manera ordenada y progresiva. Los principales órganos endocrinos involucrados en la pubertad forman parte del llamado eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG), cuya interacción dinámica favorece el ambiente propicio para el desarrollo de la pubertad^{4-6,30}:

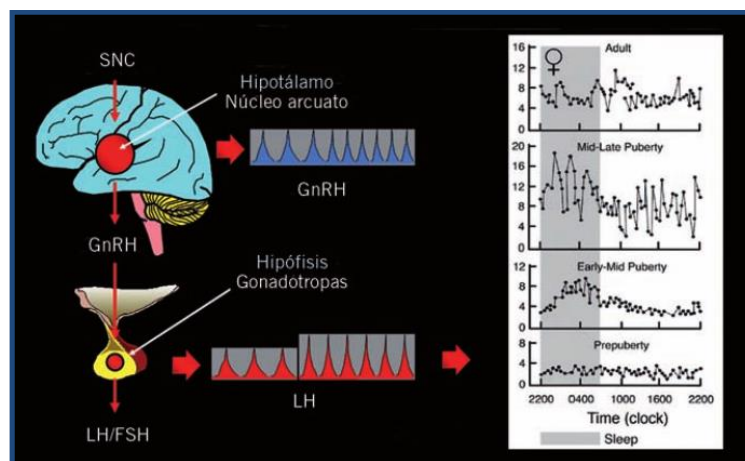
- El **hipotálamo** produce el factor liberador de gonadotropinas (GnRH), las hormonas hipotalámicas liberadoras de la hormona de crecimiento (GHRH) y de somatostatina.
- El **lóbulo anterior de la hipófisis** participa liberando las hormonas folículo-estimulante (FSH) y luteinizante (LH), así como la GH, y lo hace principalmente ante el estímulo de las hormonas hipotalámicas. Por otra parte, en la liberación de las gonadotropinas participa un fenómeno de retroalimentación de los esteroides sexuales liberados desde las gónadas.
- Las **gónadas** (ovarios), producen gametos maduros (ovocitos), y liberan esteroides sexuales, que son los responsables de los cambios físicos que se producen a lo largo de la pubertad.

Los acontecimientos que caracterizan el desarrollo de la función gonadal pueden considerarse como un fenómeno continuo que va desde la vida fetal, donde se produce la diferenciación sexual y la ontogénesis del sistema HHG, hasta la adquisición durante la pubertad de la maduración sexual completa y la fertilidad, pasando por la fase infanto-juvenil en la que el sistema permanece quiescente.

Tras el nacimiento, los niveles circulantes de FSH y LH se incrementan. Aproximadamente entre el año y los dos años de edad, los niveles de gonadotropinas disminuyen drásticamente, pasando a una fase silenciosa hasta el comienzo de la pubertad, momento en el que vuelven a elevarse. A día de hoy, se desconoce el mecanismo exacto por el que en un momento determinado de la vida, distinto para cada individuo, aumentan de nuevo estas hormonas permitiendo el desarrollo puberal. En definitiva, se trata de un mecanismo hipotalámico muy complejo, en el que intervienen tanto factores activadores como inhibidores.

Ya desde los años setenta se dio a conocer la importancia, al inicio de la transición puberal, del aumento de la amplitud de los pulsos de LH durante la noche como primera manifestación endocrina del inicio de la pubertad en humanos³¹ (figura 2). Con posterioridad, en animales se supo que el aumento en la producción de LH era secundario a los cambios en la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH liberados desde el hipotálamo^{32,33} y en humanos se demostró que estos pulsos de LH podrían provocarse administrando de forma periférica análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH)³⁴. El hallazgo de la producción de factor liberador de la hormona luteinizante en las células extirpadas de un hamartoma hipotalámico en una lactante con pubertad precoz, mostró el mismo mecanismo en estos tumores³⁵.

Figura 2. Marcadores del inicio de la pubertad. Picos de LH (tomado de referencia 4)



El aumento de la liberación de FSH y LH conlleva la estimulación de las gónadas, provocando la maduración de las células germinales y la formación de esteroides sexuales. En la mujer, la FSH mantiene la función de las células de la granulosa y la maduración del folículo ovárico, al tiempo que estimula la secreción de estradiol. Este último es responsable del desarrollo de las mamas, de los cambios sobre los genitales externos e

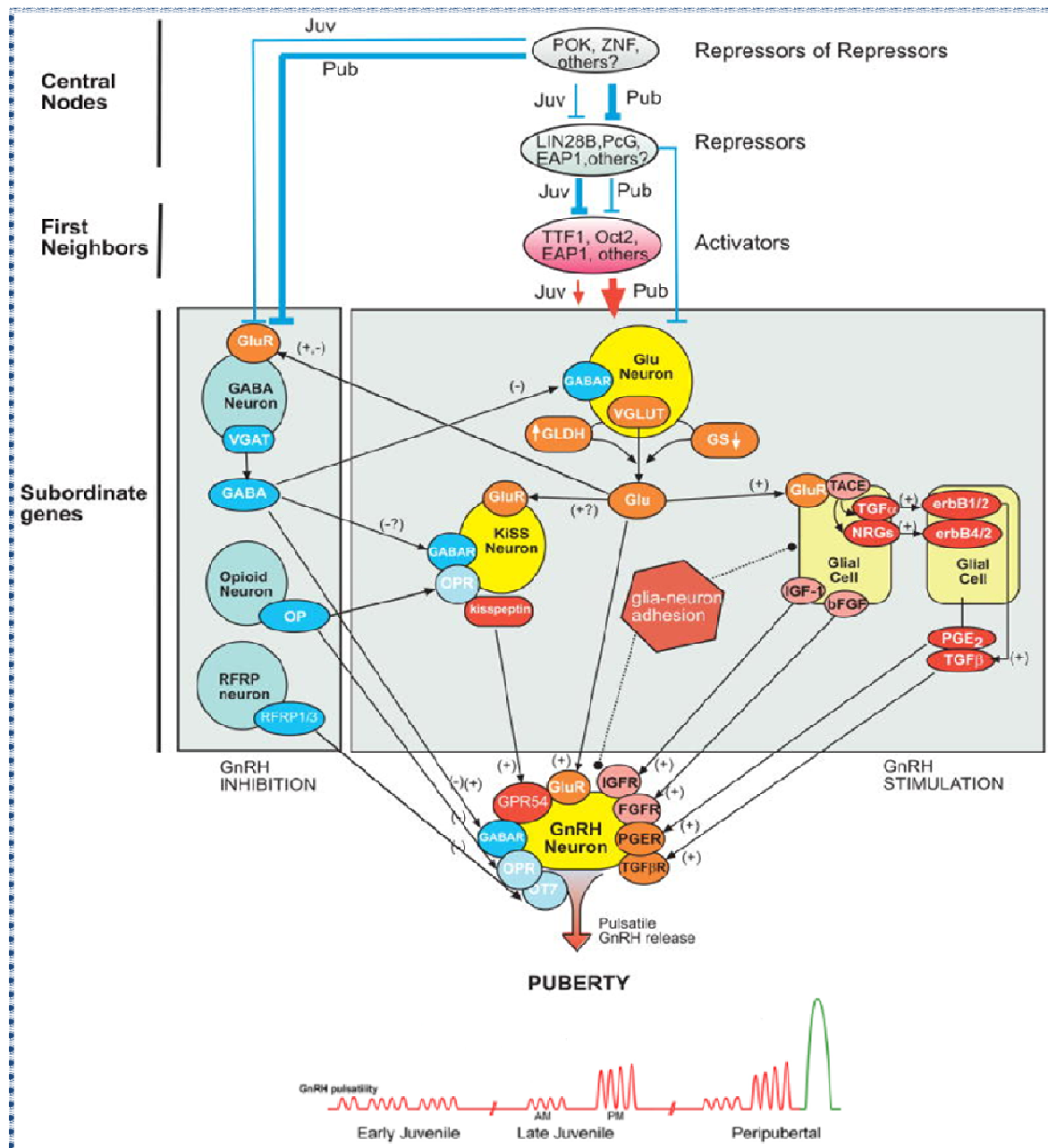
internos, de la distribución de la grasa corporal, del cierre del cartílago de crecimiento y, en combinación con la FSH y LH, interviene en la maduración de los folículos primordiales⁴⁻⁶.

4.2. REGULACIÓN DE LA GENERACIÓN DE PULSOS DE GnRH

El mecanismo que regula el inicio de la pubertad está mediado por un complejo sistema en el que se estimula la secreción pulsátil de la GnRH en el hipotalámico, sistema llamado **generador de pulsos de GnRH**³⁶. Estos pulsos de GnRH activan el eje gonadotropo, cuyo resultado final es la maduración gonadal completa (figura 3). En este sistema interaccionan³⁶⁻³⁸:

- **Señales endocrino-metabólicas:** informan del estado metabólico y de las reservas energéticas.
- **Estímulos transinápticos:** neuronas glutamatérgicas y neuronas secretoras de kisseptina y neuroquinina como ejemplo de estímulos activadores y neuronas gabaérgicas, opiáceas y las que contienen el péptido relacionado con RFamida (RFRP) como inhibidores.
- **Estímulos gliales:** por un lado favorecen la reorganización plástica de las neuronas GnRH, lo que implica cambios en la adhesividad de las células gliales sobre ellas través de la molécula de adhesión celular tipo 1 (SynCAM1) y del receptor tipo de la proteína tirosín-fosfatasa (RPTP) y, por otro lado, las células gliales liberan factores de crecimiento que actúan sobre receptores de las neuronas GnRH como el factor de crecimiento transformador tipo β (TGF β), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I).

Figura3. Vista general de la cadena de genes que operan a nivel neuronal y glial envueltas en la neuroregulación de la pubertad en mamíferos (tomado de referencia 30)



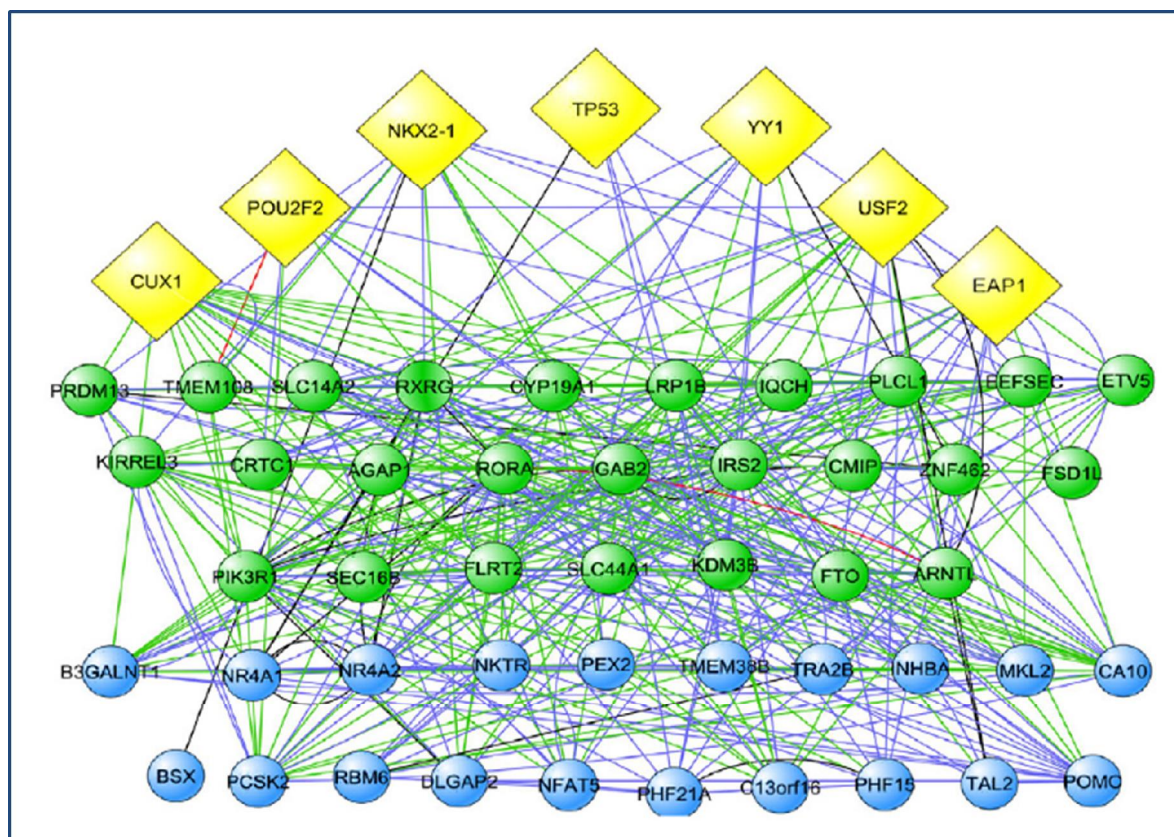
Aunque la forma en la que el reloj biológico marca la hora del inicio de la pubertad no está del todo aclarada, sí parece que todo el sistema está preparado ya desde épocas neonatales para realizarlo. Así pues, las neuronas GnRH durante el periodo prepuberal están sometidas a permanentes inhibiciones transinápticas³⁷. Cuando disminuye esta inhibición se favorece el aumento de la secreción de GnRH. No obstante, la pérdida de los estímulos inhibitorios

no es suficiente para poner en marcha la pubertad, por lo que se antoja necesario un incremento de estímulos activadores hacia las neuronas GnRH. En este punto, es donde las neuronas productoras de kisseptina han emergido como factores fundamentales, ya que el sistema neuronal productor de kisseptina se ha demostrado como el principal estimulador de la secreción de GnRH conocido hasta el momento. Sobre estas neuronas actúan, a su vez, muchas sustancias que finalmente afectan a la generación de los pulsos de GnRH necesarios para el control del inicio de la pubertad y de la función reproductora³⁹⁻⁴².

Dentro de este complejo circuito en el que interrelacionan diferentes moléculas y sus genes, las aferencias neuronales hacia las neuronas GnRH parece que operan como últimas responsables del inicio de la pubertad³⁰. En los últimos años, *Ojeda y colaboradores* postulan que la neurorregulación de la pubertad depende de redes nodales de genes que codifican proteínas cuyas acciones se solapan e interaccionan tanto de una forma jerárquica como independiente⁴³. De esta manera, se piensa que hay unos centros de actividad (*hubs*), compuestos por varios genes que previamente se habían relacionado con formación/represión de tumores (*red central TGR: CDP/CULT1/CUX1, MAF, p53, YY1, USF2*). Estos genes del centro de la red interactuarían entre ellos y, a su vez, regularían la transcripción de genes subordinados localizados en la periferia: regularían una primera red periférica de genes, que a su vez, interaccionaría con una segunda y tercera red nodal de genes. Lógicamente, la interrelación entre el eje central y la primera red de genes vecinos es superior a la del resto de redes. En esta periferia de redes nodales de genes se encuentran más de 20 genes relacionados con la edad de la menarquia descubiertos mediante la realización de estudios de asociación de genoma completo (GWAS) (Figura 4). Por otra parte, junto al sistema de regulación transcripcional antes descrito, recientemente se ha descubierto un sistema de control postranscripcional que contribuye a la regulación del inicio de la pubertad, merced a un efecto inhibitorio. La red central de este sistema la

constituye el gen *LIN28B*, que previamente, en estudios GWAS, había sido relacionado con la edad de la menarquia⁴⁴.

Figura 4. Esquema representativo de redes nodales de genes distribuidos de forma jerárquica, con un centro de actividades (*hubs*), que participan en la neuroregulación de la pubertad (tomado de referencia 43).



4.3. FAMILIA DE KISPEPTINAS

La familia de la kisleptina/receptor de kisleptina es fundamental en la regulación de la secreción de GnRH, hallazgo que ha supuesto en la última década un avance espectacular en el conocimiento de la neuroregulación de la pubertad.

Las kisleptinas son una familia de péptidos de diferente longitud, estructuralmente similares con región C-terminal común, que actúan a través de un receptor acoplado a proteína G (GPR54 o receptor de Kisleptina o KISS1R). En animales de experimentación

de sexo femenino existen poblaciones de neuronas productoras de kisseptina en los núcleos arcuato (ARC) y anteroventral periventricular (AVPV), con diferente función en cada uno de ellos: la población del núcleo ARC es fundamental para la generación de pulsos de GnRH y la del núcleo AVPV para favorecer la oleada preovulatoria de gonadotropinas⁴⁵.

Inicialmente la familia de kisseptinas fue identificada como un factor supresor de metástasis tumoral. Con posterioridad, se relacionó con la reproducción al conocer que mutaciones inactivantes del gen del receptor de kisseptina causaban hipogonadismo hipogonadotropo^{46,47}. Más recientemente, se han descubierto también mutaciones en el gen de kisseptina como responsables de hipogonadismo hipogonadotropo⁴⁸. Además, no sólo se ha relacionado con el hipogonadismo, sino que mutaciones del gen *KISS1* y de su receptor, también se han identificado como causantes de pubertad precoz central idiopática^{49,50}.

Tras estos descubrimientos en humanos que relacionaban a kisseptina con el eje reproductor, han sido muchos los estudios básicos diseñados con el propósito de conocer la implicación de este péptido en el inicio y mantenimiento de la pubertad. Así, se ha demostrado un incremento del número de neuronas productoras de kisseptina y de su expresión hipotalámica al comienzo de la pubertad, lo que estaría directamente relacionado con un incremento de la secreción de GnRH⁵¹⁻⁵⁵. Por otra parte, estudios de intervención experimental demuestran en roedores que, la administración de dosis bajas de kisseptina produce una potente respuesta gonadotropa⁵⁶, además el bloqueo farmacológico de los receptores de kisseptina retrasa el inicio de la pubertad en ratas⁵⁷ y la ablación de las neuronas de kisseptina en el periodo juvenil frena la adquisición de la capacidad reproductiva⁵⁸. En definitiva, todas estas investigaciones ponen de manifiesto el papel primordial de kisseptina en el inicio y mantenimiento de la pubertad.

Papel de co-moléculas de kisseptina en el desarrollo de la pubertad

Actualmente se habla de tachiquininas, haciendo referencia a una familia de péptidos relacionados, entre los que se encuentran la sustancia P y las neuroquininas A (NKA) y B (NKB). De todas ellas, la NKB emergió primero como regulador de la secreción de kisseptina, y posteriormente se ha visto que, al igual que ella, la sustancia P y la NKA favorecen la secreción de GnRH, para lo que se requiere la integridad del sistema de kisseptina⁵⁹.

La relevancia fisiológica y translacional de estas sustancias fue sugerida porque individuos con mutación inactivante de los genes de NKB (*TAC3*) o de su receptor (*TAC3R*), presentan un fenotipo de hipogonadismo hipogonadotropo similar a aquellos con mutaciones en el gen de kisseptina y de su receptor^{60,61}. Asimismo, en modelos de ratones con defectos en la señalización de NKB se ha demostrado menor fertilidad y menor grado de función gonadotropa, aunque su fenotipo parece ser menos importante que en humanos⁶².

En estudios básicos de neuroanatomía, se observó que un importante porcentaje de las neuronas de kisseptina del núcleo arcuato co-expresaban NKB y su receptor (NKBR)⁴⁰. Además, la expresión de otra molécula, la dinorfina, sustancia opiácea, ha sido demostrada en un subgrupo de neuronas del núcleo arcuato que a su vez co-expresan kisseptina y NKB, denominándolas neuronas KND⁶³. La dinorfina, como sustancia inhibidora de la secreción de GnRH parece tener un papel paracrino o autocrino sobre las neuronas DKN y reprime a ese nivel la liberación de kisseptina.

Desde un punto de vista funcional, varios estudios han documentado la acción estimuladora de agonistas de NKB sobre la secreción de LH tanto en especies de mamíferos adultos⁶⁴⁻⁶⁷, como en ratas prepuberales⁶⁸, efecto que está ausente en ratones con ausencia de receptor de kisseptina⁶⁵. Además, agonistas de NKB pueden estimular neuronas de kisseptina pero

no neuronas GnRH⁶⁹, sugiriendo que la NKB requiere la integridad del sistema de señalización de kisseptina para actuar en el eje gonadotropo. Otros trabajos no han documentado estas respuestas: no observan aumento de la secreción de LH con agonistas de neuroquinina^{70,71} y no muestran alteraciones del desarrollo puberal normal en ratas con ausencia congénita del receptor de NKB⁶², fenómenos que están por esclarecer.

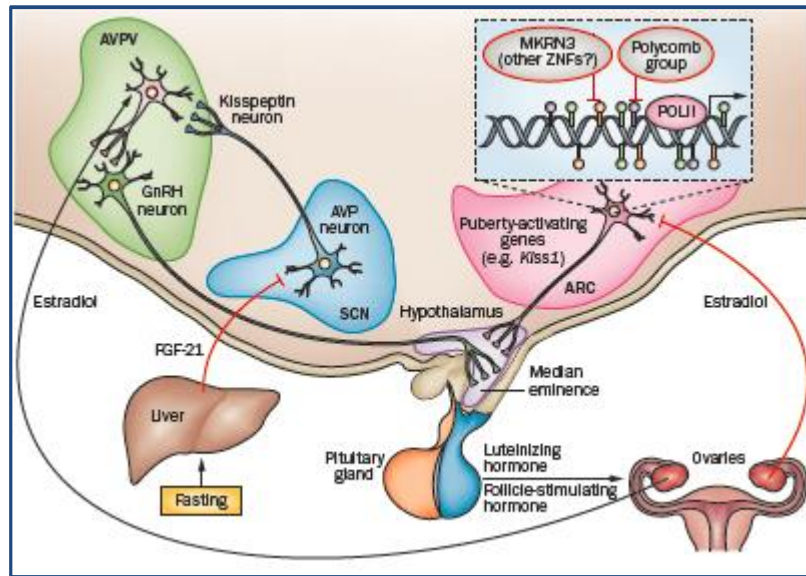
4.4. MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN EL CONTROL DE LA PUBERTAD

En el conocimiento más profundo de la neuroregulación de la pubertad, está resultando de sumo interés el estudio de los cambios en la expresión de distintos genes influidos por el ambiente, fenómenos estudiados por la epigenética. Así, existen varios mecanismos moleculares epigenéticos⁷². Algunos ejemplos de estos mecanismos son la metilación de DNA, la acetilación de histonas o los micro-RNAs, que tienen la capacidad de regular la expresión de otros genes.

En lo que respecta a estos mecanismos epigenéticos en relación con la pubertad (Figura 5), son importantes los estudios llevados a cabo por *Ojeda y colaboradores*³⁸ en los que relacionan el inicio de la pubertad con la pérdida de la represión transcripcional del gen de la kisseptina, que se produce tras la modificación epigenética de los represores transcripcionales Eed y Cbx7 (pertenecientes al grupo policombo)⁷³.

También se ha estudiado el factor de crecimiento fibroblástico 21, que se encuentra aumentado en los casos de carencia energética y que ejerce su efecto inhibiendo la expresión de los genes que codifican vasopresina en las neuronas del SNC, resultando en la pérdida de su estímulo estimulador hacia las neuronas de Kisseptina del núcleo AVPV⁷⁴.

Figura 5. Esquema de los conocimientos existentes sobre la represión transcripcional en la pubertad (tomado de referencia 38).



Tras estos hallazgos, surgieron dudas de por qué mutaciones en genes que codificaban represores transcripcionales nunca habían sido reportados en humanos con alteraciones de la pubertad. La evidencia llegó más tarde con la publicación de *Abreu y colaboradores*, donde se demostraba la presencia de mutaciones inactivantes en el gen *MKRN3* en casos familiares de pubertad precoz, gen con actividad de represión transcripcional y que, a su vez, presenta fenómeno de impronta genética⁷⁵.

Sobre el mecanismo epigenético de los micro-RNAs relativo al desarrollo puberal, varios estudios GWAS identificaron la edad de la menarquia con variaciones en la región 6q21, en la zona del gen *LINB28*⁷⁶. *LINB28* es una proteína de unión al RNA cuya función más conocida es el bloqueo del proceso de micro-RNAs de la familia *let-7*^{77,78}. Este es la primera, aunque indirecta, conexión entre el potencial papel de los micro-RNA en la regulación de la pubertad.

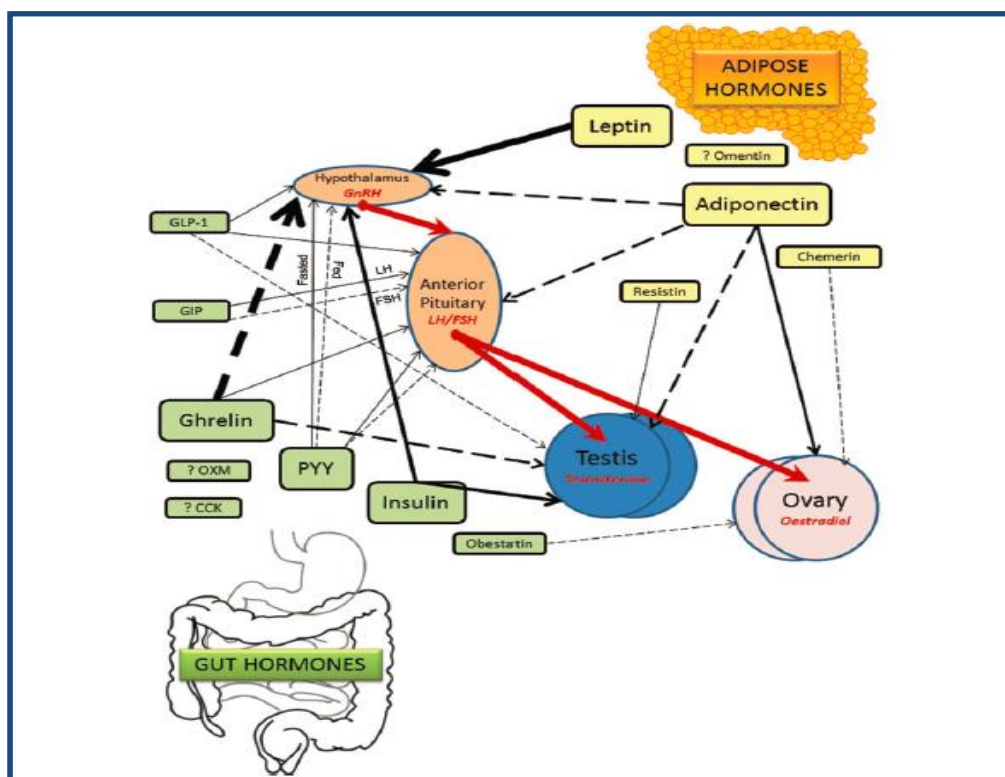
4.5. BASES GENERALES DEL CONTROL METABÓLICO DE LA PUBERTAD

El estado reproductivo es tremendamente sensible al estado metabólico y a la cantidad de energía almacenada que el individuo posee, hecho que comenzó a sospecharse ya en la década de los 70 cuando *Frisch* hablaba de un peso mínimo de 40 kg para tener la menarquia⁷⁹. Posteriormente, este mismo autor, en la década de los ochenta, hablaba de una masa grasa crítica en las mujeres necesaria para obtener una maduración reproductiva adecuada (17% del peso corporal para la menarquia y 22% para mantener la función reproductora)⁸⁰.

La cantidad de energía del organismo obtenida a través del tubo digestivo con la alimentación y almacenada, principalmente en el tejido graso, parecen claves para el inicio y mantenimiento de la pubertad (Figura 6). En esta función, intervienen muchas sustancias que ponen en relación metabolismo y reproducción, permitiendo el desarrollo puberal cuando existan unas condiciones metabólicas óptimas^{81,82}.

A lo largo de los últimos años, se han ido descubriendo distintos péptidos sintetizados en el tejido adiposo, como leptina y adiponectina, que parecen comportarse como enlace entre el estado nutricional y la reproducción y que parece que ejercen su acción de forma indirecta a través de otros sistemas como el de la kisleptina-receptor de kisleptina⁸³. Lo mismo ocurre con péptidos cuya secreción principal se realiza a nivel del sistema digestivo, como la grelina.

Figura 6. Representación esquemática de la relación entre hormonas del sistema gastrointestinal (verde) y hormonas del tejido adiposo (amarillo) con el eje reproductor (sacado de referencia 82).



A pesar de la importancia primordial de la función reproductora para la perpetuación de la especie humana, se trata de una función dependiente de energía que es prescindible para el organismo; por ello, en estados en los que se ve perturbada la homeostasis del individuo y en los que han de priorizarse las funciones básicas, la funcionalidad de este sistema puede verse anulada. Condiciones nutricionales extremas afectan al tiempo de desarrollo de la pubertad y a la función reproductiva futura. Desde el punto de vista clínico, en el ámbito de la pediatría, hay dos entidades, obesidad y anorexia nerviosa, de elevada prevalencia en nuestro medio que afectan al metabolismo y que tienen consecuencias sobre la pubertad. El sobrepeso-obesidad tiene una prevalencia cercana al 30% en la población infantojuvenil española⁸⁴ y entre los riesgos que conlleva en la infancia destaca el adelanto puberal, sobre todo en las niñas obesas²² que, a su vez, constituye otro factor de riesgo cardiovascular. Por

otra parte, la anorexia nerviosa es una patología psiquiátrica crónica en la que existe una distorsión de la imagen corporal que provoca una pauta alimentaria restrictiva/purgativa, disminuyendo notablemente la ingesta calórica, produciendo disminución del índice de masa corporal (IMC) y de la masa grasa corporal, y asociando retraso puberal y amenorrea, ya sea primaria o secundaria⁸⁵. Estudios en estos paciente nos han ayudado a mejorar el conocimiento de la influencia del estado metabólico sobre el desarrollo puberal.

4.6. DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y TIEMPO DE DESARROLLO PUBERAL

Tras la demostración del descenso de la edad del inicio de la pubertad y de la menarquia, y su paralelismo con la mejoría del estado nutricional de la población global y con el aumento de la tasa de obesidad a nivel mundial, son muchos los estudios que analizan la relación entre estos factores. Para la valoración del estado nutricional del individuo, las herramientas más fáciles, accesibles y estandarizadas son las medidas antropométricas que podemos obtener en cualquier consulta: peso, talla y perímetro abdominal. Con estos datos cuantificamos de forma indirecta la adiposidad de cada individuo, calculando el IMC, parámetro que define el grado de obesidad en cualquier población de acuerdo a las tablas de referencia y que es el más utilizado en la mayoría de los estudios. La correlación entre el grado de adiposidad y el IMC es elevada, sobre todo en individuos con sobrepeso y obesidad⁸⁶.

Menarquia y datos antropométricos a lo largo de la edad pediátrica

Muchos estudios han relacionado pubertades y menarquias más precoces en niñas con mayor IMC, sobre todo valorando este parámetro a lo largo del desarrollo puberal. Se trata de trabajos realizados en distintas poblaciones y a distintas edades; la mayoría de ellos son

transversales y tienen una conclusión común: existe una asociación inversa entre IMC y edad de la menarquia^{25,87-91}. Aunque pocos, también se ha encontrado algún trabajo que no relaciona el IMC con la edad de la menarquia^{27,92}.

Conocida esta relación entre adiposidad y desarrollo puberal, resultan interesantes los estudios longitudinales, sobre todo los que analizan la influencia de estos aspectos desde edades tempranas de la infancia, donde se podrían analizar otros beneficios de la intervención sobre la obesidad de forma precoz en la infancia. En este sentido, hay algún estudio longitudinal que encuentra relación entre el desarrollo puberal y las variables antropométricas prepuberales (principalmente analizan el IMC), incluso desde la edad preescolar⁹³⁻⁹⁷.

Por el contrario, pubertades más tardías se han relacionado con niñas que presentan menor cantidad de grasa corporal y menor peso. Así, en niñas con anorexia nerviosa con IMC disminuidos⁹⁸ y en niñas físicamente activas con un balance energético negativo⁹⁹, se ha objetivado retraso en el desarrollo puberal y en la edad de la menarquia.

En resumen, menarquias más tempranas se han relacionado con obesidad en la infancia y en la adolescencia y con un incremento rápido de peso durante la infancia, sugiriendo un papel de los aspectos metabólicos-nutricionales en la regulación del tiempo de la pubertad. No obstante, no es fácil extrapolar los resultados de los estudios sobre esta relación, ya que están realizados en distintas poblaciones, en diferentes periodos de tiempo y usan distintas formas de analizar el grado de desarrollo puberal.

Menarquia y datos antropométricos al nacimiento

La relación entre los datos antropométricos al nacimiento y la edad de la menarquia parece controvertida. Algún estudio establece relación entre menores pesos para la edad

gestacional y la edad de la menarquia, como el de *Ibañez y colaboradores* realizado en niñas españolas con pubertad adelantada, en las que se observó una edad de la menarquia más temprana ($11,3 \pm 0,3$ DE vs $12,9 \pm 0,2$ DE años) en las niñas que nacían con bajo peso para la edad gestacional (-1.5 SDS, que corresponde a peso menor de 2700 gramos en niñas a término) respecto a las que nacían con peso normal o elevado para la edad gestacional¹⁰⁰ o el trabajo realizado en una cohorte de niñas australianas, donde se observó mayor riesgo de tener una menarquia más temprana en aquellas niñas con menor ratio de peso al nacimiento / peso esperado en función de datos maternos (edad, paridad, peso, talla, edad gestacional y sexo del bebé)¹⁰¹. En cambio, otros estudios no encuentran relación entre la edad de la menarquia y los datos antropométricos al nacimiento^{27,95,102}. En consecuencia, parece necesario el diseño de estudios prospectivos multicéntricos con un adecuado tamaño muestral para aclarar esta posible relación.

4.7. SEÑALES METABÓLICAS DESDE EL TEJIDO GRASO. PAPEL DE LAS ADIPOQUINAS EN LA REGULACIÓN DE LA PUBERTAD

Actualmente, el tejido adiposo está considerado como una auténtica glándula endocrina y sus productos de secreción, denominados adipoquinas, son mensajeros químicos que actúan a diferentes niveles del organismo. Dada la importante influencia del estado nutricional y de los datos antropométricos sobre el desarrollo puberal, es lógico pensar que moléculas derivadas del tejido graso pudieran tener un papel primordial en el inicio y mantenimiento de la pubertad.

De estas moléculas derivadas del tejido graso, se han seleccionado la leptina y la adiponectina con el objetivo de estudiar su posible relación con la edad de la menarquia. Por ello ponemos en contexto los conocimientos que hasta el momento actual hay de cada una de ellas en relación con la maduración puberal.

4.7.1. LEPTINA

La leptina es un péptido de 16 kilodalton producto del gen *LEP* (7q31.3) y ha sido identificada como la adipoquina más importante en el control de la homeostasis energética. Es sintetizada fundamentalmente por adipocitos diferenciados del tejido graso subcutáneo. La identificación y caracterización de las funciones biológicas de la leptina ha sido indispensable para corroborar el nexo de unión del metabolismo y la nutrición con la regulación de la pubertad y fertilidad^{81,82}.

La leptina es segregada a la circulación de forma pulsátil, con una variación diurna que está presente a lo largo de todo el desarrollo puberal^{103,104}. Los niveles circulantes de leptina se correlacionan directamente con el contenido graso del organismo tanto en adultos¹⁰⁵ como en niños¹⁰⁶ y sus concentraciones disminuyen tras privación de alimentos y se normalizan tras la realimentación¹⁰⁷. Así, la leptina puede ser considerada una señal de adiposidad.

La acción de la leptina sobre sus órganos diana esta modulada por la cantidad de la forma circulante unida a receptor y la forma libre. Los receptores de leptina pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquinas clase I que se encuentra distribuida por todo el organismo y de la que en humanos se han identificado hasta 4 isoformas¹⁰⁸. La isoforma larga R274 (LEPR) es la única que contiene un dominio de señalización intracelular. Las mayores concentraciones de este receptor se encuentran en el hipotálamo y se considera el mediador de los efectos centrales de la leptina, actuando principalmente a través de la activación de la vía JAK (Janus Kinasa) / STAT (*signalling transducer and activator of transcripcion*). Las isoformas cortas del receptor actúan como transportadores de leptina modulando así la cantidad de leptina libre circulante¹⁰⁹ lo que permite modular su actividad¹¹⁰.

La leptina cruza la barrera hematoencefálica a través de un transportador específico, y en el sistema nervioso central modula a poblaciones neuronales situadas principalmente en los núcleos arcuato y paraventricular del hipotálamo¹¹¹. En su control de la homeostasis energética actúa principalmente activando neuronas productoras de proopiomelanocortina (POMC) y del transcriptor relacionado con cocaína-anfetamina (CART) e inhibiendo neuronas productoras de neuropéptido Y (NPY) y de *agouti-related-peptide* (AgRP) en el núcleo arcuato¹¹². Así lleva a cabo su función anorexígena y termorreguladora.

PAPEL DE LA LEPTINA EN LA NEURORREGULACIÓN DE LA PUBERTAD Y SU RELACIÓN CON LA FAMILIA DE KISPEPTINAS

El conocimiento de varios casos familiares de mutaciones del gen de leptina¹¹³ y del receptor de leptina¹¹⁴ que se caracterizaban por presentar obesidad mórbida e hipogonadismo, añadió al rol ya conocido de leptina sobre el metabolismo energético un papel importante sobre la reproducción.

Parece claro que el lugar del eje HHG sobre el que la leptina tiene mayor efecto es el hipotálamo, ya que allí es donde se localiza su receptor de forma mayoritaria¹¹⁵. De esta forma, la leptina, en el hipotálamo, modula el sistema de neuronas GnRH¹¹⁶ por un mecanismo que no es directo, ya que estas neuronas no expresan receptor funcionalmente activo de leptina^{115,117}. Esta ausencia de acción directa de leptina sobre neuronas GnRH también se describe en otros tipos de trabajos, como el de *Quennell* y *colaboradores*, donde observaron que ratas *Knockout* para receptor de leptina en todas las neuronas carecían de desarrollo puberal, mientras que ratas *Knockout* para receptor de leptina sólo en las células GnRH sí realizaban correctamente el desarrollo puberal¹¹⁸.

En esta acción indirecta de la leptina sobre las neuronas secretoras de GnRH adquiere especial importancia la kisseptina, ya que las neuronas de kisseptina han sido evidenciadas en los últimos años como sensibles al estrés metabólico¹¹⁹ y ha sido observado que, casi la mitad de estas neuronas del núcleo arcuato, expresan mRNA del receptor de leptina, hallazgo demostrado en ratones¹²⁰ y en ovejas¹²¹. Así, la kisseptina se podría considerar como el eslabón de la relación entre metabolismo y pubertad y pudiera explicar parte de los mecanismos moleculares existentes en esta relación^{122,123}. No obstante, es preciso reseñar que hay algún estudio en el que no se ha podido demostrar la presencia de receptor de leptina en las neuronas de kisseptina, aunque sí lo hacen en zonas cercanas a estas poblaciones del núcleo ARC y del AVPV²⁴.

Esta relación entre leptina y kisseptina en el hipotálamo ha sido estudiada de forma amplia, sobre todo en modelos de ratas con desnutrición. En este modelo animal se observa que los niveles de leptina están disminuidos, objetivándose también, de forma paralela, una disminución de la expresión del mRNA de *Kiss1* y un menor contenido de kisseptina en el hipotálamo, lo que finalmente produce menores niveles de gonadotropinas y un retraso puberal, situación que puede ser revertida con la administración exógena de kisseptina¹²⁵. En este mismo sentido, en mujeres con amenorrea hipotalámica secundaria a bajo peso, la administración de kisseptina produce un aumento en la secreción de gonadotropinas¹²⁶. También en ovejas sometidas a estrés metabólico con privación alimentaria se demostró una expresión hipotalámica disminuida de mRNA de *Kiss1*, situación que revierte de forma parcial tras la administración de leptina¹²¹. Así, los datos sugieren que las condiciones de insuficiencia energética pueden suprimir la funcionalidad del eje HHG mediante la inhibición de la señalización de kisseptina, merced a la información del estado energético que aporta la leptina.

Los modelos animales de sobrenutrición han sido menos estudiados y con conclusiones a veces dispares, en lo que puede influir el momento y el tiempo de la sobrenutrición en el modelo animal. En ratones adultos con exceso de peso se ha relacionado la hiperleptinemia con hipogonadismo hipogonadotrofo, traducándose en infertilidad, sugiriendo una resistencia hipotalámica a la leptina en estos casos¹²⁷. En los ratones obesos *Lep^{ob/ob}*, se demostró una expresión hipotalámica disminuida de *KissI*, situación que revierte de forma parcial tras la administración de leptina¹²⁰. También se observa una disminución de la expresión de *Kiss I* en ratones adultos con una sobrenutrición mantenida¹²⁸, mientras que en animales con sobrenutrición desde edades tempranas podría tener el efecto contrario, aumentando la expresión hipotalámica de *Kiss I* y produciendo un adelanto puberal¹²⁹.

Por otra parte, datos más recientes sugieren que la acción de la leptina sobre el hipotálamo también podría ser o bien indirecta o bien independiente del sistema de kisleptina. En esta línea, se ha constatado en modelos animales con eliminación congénita selectiva del receptor de leptina en las células de kisleptina, que no hay afectación del inicio y desarrollo de la pubertad ni de la fertilidad¹³⁰. Además, hay estudios que demuestran que la acción reproductora de la leptina también se lleva a cabo a través de núcleos hipotalámicos en los que no hay población de neuronas productoras de kisleptina, como es el caso del núcleo ventral premamilar. En esta zona hipotalámica, parece que existe una posible interacción de la leptina con el sistema glutamatérgico, del que conocemos su papel como activador del eje HHG¹³¹. En este sentido, estudios posteriores del mismo grupo demuestran que existen proyecciones desde el núcleo ventral premamilar hacia las neuronas de kisleptina, lo que de nuevo aproximaría a la leptina al circuito de la kisleptina, ahora de un modo indirecto¹³².

Más recientemente, se ha identificado un posible papel de señalización que envuelve al sensor de energía celular mTOR (diana de rapamicina en mamíferos) en la conexión central entre leptina y kisleptina¹³³, sugiriéndose una vía leptina-mTOR-kisleptina fundamental en el control metabólico de la pubertad, del que no es conocida su localización anatómica y de la que no hay conexión directa, ya que las neuronas productoras de kisleptina no son dianas de mTOR¹²⁸.

También investigaciones en modelos animales van a favor de una distinta respuesta de señalización a través de neuronas POMC y del NPY en situaciones de sobrenutrición y normopeso ante la administración de leptina exógena en estos dos modelos animales¹³⁴. La influencia de la leptina en el control metabólico de la pubertad tiene lugar desde la época neonatal, como parece demostrarse en estudios en ratas en las que se administra antagonista de leptina el día 9 y se estudian prepuberalmente cambios en los mecanismos moleculares implicados en la pubertad¹³⁵.

LEPTINA Y DESARROLLO PUBERAL EN HUMANOS

El papel fundamental de la leptina sobre el desarrollo puberal comenzó tras la observación en humanos de que mutaciones inactivantes del gen de leptina y de su receptor eran causantes de obesidad mórbida de instauración temprana y de hipogonadismo hipogonadotropo^{113,114} siendo el grado de hipogonadismo variable en estos pacientes¹³⁶; además, el tratamiento con leptina recombinante mejoraba la secreción nocturna pulsátil de gonadotropinas en estos pacientes¹³⁷.

Los niveles de leptina son significativamente superiores en las mujeres que en los hombres a lo largo de la infancia, a igualdad de edad e IMC¹³⁸. Estas diferencias entre sexos son ya evidentes en la sangre del cordón umbilical a partir de la semana 30 de gestación¹³⁹. En las

niñas, los niveles de leptina, comienzan a ascender de forma progresiva desde los 7 años hasta aproximadamente los 15 años, paralelamente al incremento de masa corporal¹⁴⁰.

A lo largo de la pubertad se observa una disminución de la leptina que circula unida a su receptor por haber menor cantidad de éste^{109,141}, habiendo mayor cantidad y proporción circulante de la forma activa, y existiendo una correlación de los niveles de estradiol con la cantidad de leptina libre circulante¹¹⁰. En la pubertad también encontramos un dimorfismo sexual en los niveles de leptina, sobre todo desde estadios intermedios del desarrollo, observándose en las mujeres púberes un aumento progresivo de sus niveles a lo largo del mismo, mientras que en los varones se observa un aumento hasta los estadios Tanner II-III con disminución posterior^{106,110,142,143}. Este aumento paulatino de los niveles plasmáticos de leptina en las mujeres se inicia 2 años antes del aumento en los niveles de LH y del estradiol, lo que sugiere que la leptina puede ser un factor clave en el inicio de la pubertad femenina¹⁴². En este sentido, se consideró necesario unos niveles mínimos de leptina (12 ng/ml) en la adolescencia para el establecimiento de los ciclos menstruales¹⁴⁴. Estos datos apuntan a un papel permisivo de la leptina sobre el inicio del desarrollo puberal.

Evidencia de afectación del desarrollo puberal en situaciones de malnutrición y su relación con los niveles de leptina

La leptina ha sido considerada causante del déficit de desarrollo puberal que se produce en ciertos modelos de estrés metabólico con balance energético negativo, como es el caso de la anorexia nerviosa o de ciertas deportistas. De esta forma, las mujeres con anorexia nerviosa muestran una disminución de la concentración de leptina y de sus variaciones diurnas, lo que va en paralelo con la disminución de la masa grasa. Además, en estas pacientes los niveles circulantes de leptina están principalmente unidos a su receptor, disminuyendo los niveles de la forma libre circulante y limitando su biodisponibilidad^{106,145}. El grado de

recuperación de peso en pacientes con anorexia nerviosa tras una terapia nutricional se correlaciona con un incremento en los niveles de leptina^{85,106}. En paralelo, el aumento de leptina se correlaciona con el incremento de los niveles de gonadotropinas¹⁴⁶, lo que sugiere que la primera pueda promover la activación del eje HHG. Además, el aumento de los niveles de leptina libre tras la recuperación del peso se ha asociado con la recuperación de los ciclos menstruales en las mujeres con anorexia nerviosa¹⁴⁷. No obstante, no todas las niñas con anorexia nerviosa que recuperan peso y adquieren una cantidad de masa grasa normal recuperan de forma espontánea los ciclos menstruales¹⁴⁸. Además, los niveles de leptina circulantes pueden ser similares en niñas con anorexia nerviosa tanto con amenorrea como eumenorreicas¹⁴⁹. Actualmente no hay una explicación clara que puede aclarar este último hallazgo, pero convendría recordar que la etiología de la anorexia nerviosa es diversa y que incluye diferentes comportamientos psiquiátricos y comorbilidades, de tal forma que otros factores, aparte de la leptina, podrían estar implicados en la regulación del eje HHG en estas pacientes.

Otro ejemplo son las adolescentes atletas de élite. Así, hasta en un 50% de estos casos en los que existe un balance energético negativo se produce amenorrea hipotalámica, como consecuencia de la disminución de la secreción de GnRH, lo que conduce a menores niveles de gonadotropinas y estrógenos circulantes¹⁵⁰. Estos hallazgos coinciden con una disminución de los niveles séricos de leptina y con la pérdida de su patrón diurno de secreción^{99,145}.

En pacientes con amenorrea hipotalámica, estudios experimentales, han evaluado el efecto de la administración de leptina recombinante, mostrando un aumento de la frecuencia de los pulsos de LH, un incremento de los niveles séricos de LH así como una mejoría de la funcionalidad ovárica¹⁵¹. Además, en mujeres con amenorrea hipotalámica secundaria a

bajo peso, la administración de kisseptina estimula la secreción de gonadotropinas¹²⁶, demostrando la necesidad de ambas moléculas para la secreción de gonadotropinas.

Evidencia de afectación del desarrollo puberal en situaciones de sobrenutrición y su relación con los niveles de leptina

De forma contraria a lo observado en modelos de malnutrición y como se ha comentado previamente, la obesidad en niños puede acelerar el inicio de la pubertad²². En consonancia con lo dicho previamente, existe una correlación positiva entre los niveles de leptina y el IMC, observándose que niños y adolescentes obesos tienen mayores niveles de leptina que los sujetos delgados, niveles que disminuyen significativamente tras la pérdida de peso¹⁰⁶. Los elevados niveles de leptina que acompañan a la obesidad parecen jugar un papel importante en la aceleración puberal en estos pacientes¹⁴³. Curiosamente, efectos a largo plazo de la hiperleptinemia sobre la función gonadal podrían ser deletéreos, produciendo un hipogonadismo y una menor fertilidad, como se observó hace años en adultos obesos¹⁵². Lo mismo que en modelos animales donde el inicio de hipogonadismo de origen hipotalámico puede ocurrir en etapas avanzadas de la vida en ratones que sobreexpresan leptina^{127,153}.

En definitiva, parece clara la influencia de la leptina, como marcador de suficiencia energética, sobre el inicio y mantenimiento de la pubertad a través de un papel estimulador. En nuestro conocimiento, hay pocos estudios que analicen la relación de los niveles de leptina, sobre todo desde la época prepuberal, con la edad de la menarquia.

4.7.2. ADIPONECTINA

La adiponectina es una adipoquina de 244 aminoácidos que es secretada únicamente por adipocitos del tejido adiposo blanco^{82,154}. Característicamente, es la adipoquina que circula

a mayor concentración y sus niveles, al contrario que otras adipoquinas como la leptina, disminuyen notablemente en individuos con obesidad y se incrementan con la pérdida de peso^{82,155,156}. Hasta la fecha, a este péptido se le ha relacionado fundamentalmente con la sensibilidad a la insulina, es decir, a mayor concentración de adiponectina mejor sensibilidad a la insulina. Por otra parte, también son conocidos sus efectos antiinflamatorios y antiaterogénicos¹⁵⁷. Sus acciones están mediadas a través de la activación de tres receptores periféricos: AdipoR1, AdipoR2 y t-cadherina¹⁵⁸.

RELACIÓN DE LOS NIVELES DE ADIPONECTINA CON LA PUBERTAD

Las concentraciones de adiponectina generalmente disminuyen junto al incremento de la adiposidad de los adolescentes. Sus niveles tienen una asociación positiva con la sensibilidad a la insulina que parece ser independiente del nivel de adiposidad. Por otra parte, los niveles circulantes de adiponectina están influidos por el desarrollo puberal observándose un dimorfismo sexual, de forma que los niveles de adiponectina no parecen cambiar durante la pubertad en las niñas, y parecen disminuir a partir de la mitad del desarrollo puberal en los niños¹¹⁰, explicando la presencia de niveles más bajos en varones que en mujeres adultas. Esta disminución de la adiponectina en la segunda mitad del desarrollo puberal en los varones va en paralelo con el aumento de los niveles de andrógenos circulantes y se correlaciona de forma positiva con los niveles circulantes de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG)^{110,159}. Dada su relación con la sensibilidad a la insulina, la disminución de sus niveles a lo largo de la pubertad en los niños podría explicar, al menos en parte, la disminución de la sensibilidad a la insulina que se produce en esta época puberal en los varones¹⁶⁰.

En un estudio de niñas que practicaban ballet de forma que tenían un balance energético deficiente de acuerdo al grado de actividad física que realizaban, se observó una edad de la

menarquia un año más tardía en comparación con otras niñas, y se observó que los niveles de adiponectina aumentaban a lo largo de la pubertad, niveles que se correlacionaban negativamente más con la cantidad de grasa que con el índice de masa corporal⁹⁹ de acuerdo a lo previamente comentado y en consonancia con la relación existente entre ejercicio y niveles de adiponectina¹⁶¹.

PAPEL DE LA ADIPONECTINA SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-GONADAL

La molécula de adiponectina es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, pudiendo ejercer acciones en el sistema nervioso central. En este sentido, se ha demostrado la expresión de AdipoR1 en el hipotálamo de humanos¹⁶². Además, los niveles de adiponectina se encuentran elevados en condiciones de alteración de la secreción de GnRH, como es el caso de los hipogonadismos hipogonadotropos¹⁶³ y de la anorexia nerviosa¹⁶⁴. De esta forma, se le ha adjudicado un papel inhibitorio sobre las neuronas secretoras de GnRH, papel que parece ejercer vía AMPK (*mitogen activated protein kinases*) con disminución de ERK (*extracellular signal regulated kinases*)^{165,166}, por una regulación de la transcripción del gen de kipeptina también a través del AMPK¹⁶⁷. También parece ejercer alguna acción sobre la hipófisis, ya que se ha demostrado expresión de su receptor en células gonadotropas¹⁶². Además, se ha documentado en ratas que la respuesta de la disminución de la secreción de LH producida por la administración de adiponectina no se revierte suministrando GnRH^{168,169}.

Para resumir, la adiponectina se correlaciona de forma inversa con el nivel de adiposidad del organismo y parece tener un papel inhibitorio en el desarrollo puberal, merced a una acción indirecta a nivel hipotalámico sobre la secreción de GnRH y gracias a un efecto directo sobre la secreción de gonadotropinas. Sobre esta molécula, en nuestro conocimiento

no hay estudios que relacionen sus niveles desde la época prepuberal con la edad de la menarquia.

4.8. SEÑALES METABÓLICAS DESDE EL SISTEMA DIGESTIVO

Es bien conocido que el tracto gastrointestinal y el páncreas participan en el control central de la homeostasis energética, bien a través de mecanismos neuronales directos o bien por la secreción de hormonas al torrente sanguíneo capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y ejercer su acción en el hipotálamo, donde se encuentran los principales centros de regulación energética.

De todos los péptidos secretados a este nivel, en nuestro estudio hemos seleccionado la grelina y la insulina, por lo que a continuación resumimos el papel de cada una en el desarrollo puberal.

4.8.1. GRELINA

La grelina es un péptido de 28 aminoácidos derivado de la pre-pro-grelina y está codificada por el gen *GHRL* (3p26-p25). Este péptido es el ligando del receptor secretagogo de la hormona de crecimiento tipo Ia, receptor que posteriormente se ha renombrado como receptor de grelina¹⁷⁰.

La grelina está principalmente producida por las células oxínticas de la mucosa gástrica, aunque también se produce en intestino, páncreas, hipotálamo e hipófisis¹⁷¹. La molécula de grelina se somete a acilación en el aminoácido serina en la posición 3, lo que permite a esta forma acilada cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a su receptor¹⁷². La isoforma no acilada de la grelina es la forma más abundante en el plasma y, aunque inicialmente se la consideraba como una forma inactiva, actualmente se sabe que esta forma también es activa

y tiene un rango de acciones que, en ocasiones, puede superponerse con la de la forma acilada¹⁷³.

La grelina, al ser inicialmente reconocida como ligando endógeno del receptor secretagogo de la hormona de crecimiento, se definió como estimulante de la GH¹⁷⁴. Investigaciones posteriores, mostraron un amplio rango de funciones, tanto endocrinas como no. De todas ellas, hay que destacar su función en la regulación de la homeostasis energética.

CONTROL DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA Y REGULACIÓN DEL APETITO

La grelina es la principal hormona orexígena circulante¹⁷⁵. Su principal efecto orexígeno lo ejerce en el hipotálamo, por un mecanismo que parece antagonista al de la leptina. Así, la administración central de grelina en ratas estimula la ingesta de alimentos y la ganancia de peso. Estas acciones, independientes de la GH, se suceden a través de la activación de neuronas productoras de NPY y AgRP, ya que anticuerpos antagonistas de estas sustancias anulan el aumento de la ingesta producido por la grelina¹⁷⁶. Además, ratones con ausencia de NPY/AgRP no tienen esta respuesta del aumento de la ingesta tras la administración de grelina¹⁷⁷. En humanos, en un estudio realizado con voluntarios, se observó que la infusión intravenosa de grelina aumentó el apetito e incrementó la ingesta de comida¹⁷⁸.

GRELINA Y NEURORREGULACIÓN DE LA PUBERTAD

El papel de la grelina en la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal ha sido estudiado en varias especies y en diferentes estados fisiológicos. De acuerdo con su supuesto papel como señalizador de estados de insuficiencia energética, estudios experimentales, realizados principalmente en roedores, han documentado una acción inhibitoria de la grelina en el inicio de la pubertad. Este fenómeno se ve reflejado en

estudios de administración de grelina, en los que se observa una disminución de los niveles circulantes de gonadotropinas (principalmente de LH) y se objetiva un retraso en el desarrollo de diferentes ítems de la maduración puberal en ratas masculinas^{179,180}. Posteriormente, se demostró el mismo efecto en ratas femeninas, pero requiriendo mayores dosis de infusión y mayores niveles circulantes de este péptido¹⁸¹. Así, parece que el sexo femenino es menos sensible al efecto inhibitorio de la grelina sobre el eje reproductor.

En humanos, el papel directo de la grelina en la pubertad no ha sido claramente documentado, aunque se ha objetivado una reducción progresiva de sus niveles a lo largo de la pubertad¹⁸², lo que podría suponer un papel permisivo de este descenso de los niveles para el inicio de la pubertad.

En niños con talla baja a los que se les sometió a pruebas de estímulo de hormona de crecimiento previa primación con esteroides sexuales, se cuantificaron los niveles de grelina antes y después de su administración de estos esteroides sexuales. Así, el aumento farmacológico de los niveles de esteroides sexuales se asoció con una disminución de los niveles de grelina en niños, efecto que no se objetivó en niñas, demostrando una interacción entre ambas moléculas y una mayor influencia de la grelina en el sexo masculino¹⁸³.

La grelina también parece actuar como señal inhibitoria en la edad adulta, habiéndose demostrado que la administración de grelina a sujetos sanos disminuye la secreción basal de LH, supuestamente actuando en el hipotálamo disminuyendo la secreción de GnRH, ya que la administración concomitante de GnRH inactiva la disminución de la secreción LH por parte de grelina¹⁸⁴.

Por otra parte, la acción de la grelina en la disminución de los niveles de LH ha sido documentada tanto tras la administración de la forma acilada como la de la forma no

acilada¹⁷³. Esto plantea la posibilidad de que existan otros receptores u otras formas de interacción de la grelina sobre el eje.

Realmente, el mecanismo por el que la grelina participa de forma central en el control del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal se desconoce, aunque parece que su diana principal del eje es el hipotálamo, a través de las neuronas productoras de GnRH, tratándose más de una vía indirecta, a través de neuronas intermediarias, que de una acción directa sobre estas neuronas GnRH, habiéndose relacionado, en parte, con el sistema kisleptina. La mayor evidencia de esta relación viene de estudios en ratas masculinas en las que se demuestra que la inyección de grelina disminuye la duración de la respuesta secretora de la LH a la administración de kisleptina¹⁸⁰.

La grelina también podría actuar a otros niveles del eje. Dada la diferente respuesta de las gonadotropinas LH y FSH tras su administración, podría pensarse en una acción directa de la grelina sobre la hipófisis, pero ésta no se ha documentado de forma clara. Si parece que pueda tener un papel directo sobre las gónadas, ya que tanto en ovarios como en testículos se ha documentado expresión de grelina y de su receptor¹⁸⁵. Además, se ha visto en estudios *in vitro* de células luteínicas de la granulosa, que la grelina disminuye la producción de esteroides sexuales¹⁸⁶.

NIVELES CIRCULANTES DE GRELINA

Los niveles circulantes de grelina son pulsátiles, con ciclos diurnos y con niveles crecientes por la noche¹⁰⁴. Antes de la ingesta de comida, los niveles de grelina se encuentran aumentados y tras la ingesta de comida, se inhibe la secreción de ambas formas de grelina, disminuyendo sus niveles circulantes¹⁸⁷. En cambio, el ayuno prolongado inhibe la acilación, pero no la secreción total de grelina, disminuyendo la forma activa circulante¹⁸⁸,

lo que sugiere un mecanismo de adaptación a esta situación. Los niveles circulantes de grelina, tienen una correlación negativa con el índice de masa corporal¹⁸⁹⁻¹⁹¹ y con la masa grasa¹⁹² por lo que se piensa que la grelina actúa a medio plazo como marcador de insuficiencia energética, con una interacción recíproca con la leptina, señal de abundancia.

Los niveles de grelina están aumentados en anorexia nerviosa¹⁹³, en alteraciones de la conducta alimentaria en mujeres con peso normal¹⁹⁴ y en casos de mujeres con amenorrea hipotalámica secundaria a ejercicio en comparación con otras mujeres sedentarias con el mismo IMC y niveles de leptina¹⁹⁵. Así, el ayuno, la alteración de la conducta alimentaria y el exceso de ejercicio, pueden producir niveles aumentados de grelina y podrían jugar un papel fisiológico a través de GnRH y LH en suprimir el eje reproductor, asociando alteraciones menstruales.

Por otra parte, los niveles de grelina son variables a lo largo de la infancia y están influenciados también por el crecimiento y el desarrollo puberal, observándose niveles de grelina aumentados los primeros dos años de vida, con una disminución paulatina de los mismos hasta el final de la pubertad¹⁸².

Parece existir un dimorfismo sexual en los niveles circulantes de grelina, siendo mayores en las mujeres, y existiendo una correlación con los niveles circulantes de testosterona tanto en varones como en mujeres adultas¹⁹⁶. En adolescentes, nuestro grupo ha objetivado que los niveles de grelina son significativamente mayores en niñas que en niños (datos no publicados). Esta diferencia demostrada de niveles de grelina a esta edad estaría a favor de la mayor sensibilidad que tendría la grelina sobre el eje reproductor en el sexo masculino.

En consecuencia, la grelina parece desempeñar un papel clave en el desarrollo puberal mediante un efecto inhibitorio, como señalizador de estados de insuficiencia energética.

Para nuestro conocimiento, no hay estudios que relacionen los niveles de este péptido en la edad prepuberal con la edad de la menarquia.

4.8.2. INSULINA

La insulina, hormona producida por las células beta pancreáticas, es fundamental para el control del metabolismo de los hidratos de carbono y de las grasas, y también juega un papel importante como regulador del balance energético a nivel hipotalámico¹⁹⁷.

Tanto la insulina como su receptor, presentan altas concentraciones en el hipotálamo, sobre todo en el núcleo ARC. La cantidad de insulina en el sistema nervioso central depende de un transportador saturable de insulina a través de la barrera hematoencefálica¹⁹⁸.

Sabemos que la ingesta aumenta la cantidad de insulina circulante y el ayuno la disminuye¹⁹⁹. En esta línea, la insulina constituye un mecanismo de retroalimentación negativa sobre el sistema nervioso central, especialmente en el hipotálamo, informando de la ingesta de comida y de los almacenes energéticos del organismo. De esta forma, esta hormona, actúa como señal anorexígena. Así, los pacientes con anorexia nerviosa tienen niveles circulantes de insulina muy bajos frente a los obesos, que muestran cifras elevadas de insulina^{200,201}.

ACCIONES DE LA INSULINA SOBRE EL EJE GONADOTROPO

Existen evidencias, surgidas de distintos estudios experimentales, que relacionan a la insulina con el eje gonadotropo, adjudicándole un papel activador como marcador de suficiencia energética, similar al de la leptina. Así, se ha reportado que ratones con alteración selectiva del receptor de insulina en poblaciones neuronales desarrollaban obesidad y presentaban un hipogonadismo hipogonadotropo²⁰². No obstante, el modo en

que la insulina puede influir sobre la reproducción no está claro. Aunque las neuronas GnRH expresan receptores de insulina y estas células se activan en respuesta a la misma²⁰³, el sitio principal de actuación de la insulina parece ser distinto de las neuronas GnRH, ya que el fenotipo de hipogonadismo hipogonadotrofo y obesidad observado en ratones con ausencia de receptor de insulina a nivel neuronal, no se observa en modelos de ratones con ausencia de receptor de insulina selectivo en las neuronas GnRH²⁰⁴. Por otra parte, la insulina, como la leptina, parece regular las neuronas GnRH no de una forma directa sino a través de un mecanismo interneuronal. Uno de los mecanismos por los que la insulina puede actuar es la acción directa sobre neuronas POMC, neuronas que son reguladoras de la homeostasis energética en respuesta a señales periféricas, como la leptina. Modelos de ratas con ausencia de receptor de insulina y leptina en las neuronas POMC demuestran aumento de los niveles de testosterona y alteraciones en el ovario²⁰⁵, sin afectar a los niveles de LH, prolactina, estrógenos o GnRH, demostrando una adecuada función GnRH. Estas alteraciones no ocurren en aquellos modelos animales en los que sólo se altera uno de los receptores, indicando la importante respuesta de la coordinada acción de los receptores de leptina e insulina²⁰⁵.

Otro posible mecanismo de acción hipotalámico de la insulina es la inhibición de las neuronas hipotalámicas del NPY, neuronas, que a su vez, inhiben la producción de GnRH²⁰⁶. Estos hallazgos apoyan un papel permisivo de la insulina sobre las neuronas GnRH hipotalámicas, actuando junto a la leptina sobre neuronas POMC y NPY.

En ovejas sometidas a restricción de alimentos, el rescate de la secreción pulsátil de LH al restaurar la alimentación (lo que ocurre antes de cualquier cambio en los niveles circulantes de leptina), está precedido por un incremento en los niveles de insulina circulantes²⁰⁷, lo que sugiere que los pulsos de LH son reiniciados por cambios en la disponibilidad de

insulina. También, ratones con ausencia de receptores de insulina en las neuronas de kisseptina presentan un retraso en la pubertad, retraso en la apertura vaginal en hembras y en el crecimiento testicular en machos en el día 31²⁰⁸. Estos datos indican que las neuronas de kisseptina pudieran ser mediadoras del efecto de la insulina en el desarrollo puberal. Sin embargo, este fenómeno parece estar limitado al inicio de la pubertad porque mediciones de LH, FSH, esteroides sexuales y fertilidad no se alteran en los mismos modelos de ratas adultas²⁰⁸. En consistencia con los datos anteriores, el tratamiento con insulina no parece restaurar la expresión del mRNA de *Kiss1* en el hipotálamo de ratas diabéticas²⁰⁹.

En humanos se ha descrito un dimorfismo sexual en respuesta a la insulina, siendo menor en el sexo masculino. La media de los niveles de LH y la amplitud de los pulsos de LH no se modifican en respuesta a la hiperinsulinemia euglucémica en ninguno de los dos sexos, pero en mujeres sí se observa un aumento de la frecuencia de los pulsos de LH²¹⁰, lo que indica una acción sobre las neuronas GnRH, ya que este efecto no puede ser llevado a nivel puramente hipofisario. Estos hallazgos no son consistentes con estudios previos en mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP), en los que no se veía este hallazgo²¹¹. Estas diferencias entre estos estudios pueden ser debidas a diferencias entre la adiposidad de las mujeres y a los niveles de insulina alcanzados. En el trabajo realizado por *Patel y colaboradores* en mujeres con SOP (síndrome en el que característicamente hay una mayor frecuencia de pulsos de LH, mayores niveles de LH y mayor ratio LH/FSH con respecto a las mujeres con ciclos menstruales normales), ha revelado que la hiperinsulinemia euglucémica a lo largo de 12 horas no tiene efecto sobre la secreción de LH. Además, la respuesta de LH frente a GnRH no se ve influenciada por la administración de insulina²¹¹. Estos datos en su conjunto indican que los niveles elevados de insulina presentes en estas mujeres parecen no estar relacionados directamente con el incremento de la pulsatilidad y los valores de LH.

Además, los niveles de insulina están relacionados con los niveles de otras moléculas relacionadas con la adiposidad que también tienen un papel en el eje reproductor, sugiriendo un mecanismo complejo de interacción. La hiperinsulinemia incrementa los niveles de leptina de manera dosis dependiente²¹². Además, la leptina potencia el efecto de la insulina sobre la secreción de GnRH²¹³ y mejora la homeostasis de la glucemia en ratones obesos incrementando la sensibilidad hipotalámica a la insulina²¹⁴. Por el contrario, la insulina disminuye los niveles en plasma de grelina²¹⁵.

En resumen, se asume un papel permisivo de la insulina sobre el desarrollo puberal, cuyo efecto podría ejercerlo sobre neuronas productoras de GnRH en el hipotálamo, aunque en esta respuesta pudiera mediar el efecto de otras moléculas similares, como la leptina.

Hipótesis

HIPÓTESIS

La menarquia constituye un punto clave del desarrollo puberal de las niñas, proceso biológico tremendamente complejo que precisa de una alta demanda energética. La edad de la menarquia, además de estar condicionada por el estado nutricional en el momento del desarrollo puberal, podría estar influenciada por el estado nutricional en las épocas neonatal y prepuberal, así como por variaciones de este estado nutricional entre los periodos neonatal, escolar y de la adolescencia. En esta línea, moléculas implicadas en el control metabólico del organismo, como leptina, adiponectina, grelina e insulina, influirían sobre la edad de la menarquia, pudiendo sus niveles sanguíneos, ya desde época prepuberal, desempeñar un papel predictor sobre el tiempo de desarrollo puberal.

OBJETIVOS

1. Caracterizar la edad de la menarquia en una muestra de población española.
2. Estudiar la influencia de los parámetros antropométricos del periodo neonatal sobre la edad de la menarquia.
3. Valorar la influencia del estado nutricional en las niñas a los 6-8 años sobre la edad de la menarquia. Analizar si cambios en las variables antropométricas a lo largo de la infancia (entre el nacimiento y los 6-8 años, y los 6-8 años y la adolescencia) pueden afectar a la edad de la menarquia.
4. Evaluar cómo los niveles de leptina, adiponectina, grelina e insulina a la edad de 6-8 años pueden influir en la edad de la menarquia.
5. Analizar la evolución de leptina, adiponectina, grelina e insulina entre la edad prepuberal y la adolescencia y valorar su posible influencia sobre la edad de la menarquia.

Material y métodos

1. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

1.1. POBLACIÓN

La población integrante de nuestro trabajo está constituida por niñas del Estudio Cuatro Provincias. Este estudio multicéntrico fue diseñado para evaluar factores de riesgo cardiovascular en niños de cuatro provincias españolas con distinta tasa de mortalidad cardiovascular: Madrid, Orense, Cádiz y Murcia^{216,217}. Se realizaron dos cortes transversales: el primero entre los años 1997 y 2000 y el segundo entre el 2004 y el 2008. La recogida de datos y la extracción de muestras sanguíneas se llevó a cabo siempre en la misma época del año, en los meses de marzo y abril. En el primer corte participaron 1327 niños (49,8% niñas) entre 6 y 8 años y en el segundo corte 930 niños (52,5% de niñas) entre 12 y 16 años.

El protocolo del estudio y sus posteriores actualizaciones, fueron aprobados por el Comité Ético del Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz ([anexo I](#)). El conjunto de la investigación cumple las salvaguardias éticas de la Delegación de Helsinki y la legislación española sobre investigación clínica en humanos.

Este trabajo incluye un subgrupo de 195 niñas que participaron en los cortes del estudio, primero a los 6-8 años de edad y posteriormente, siete años más tarde, cuando tenían entre 13 y 16 años, y de las que conocíamos el dato de la edad de la menarquia. Se excluyeron del estudio a las niñas que presentaban cualquier tipo de patología crónica, incluyendo pubertad precoz, y las niñas que estuvieran en tratamiento con alguna medicación, bien sea por patología aguda o crónica.

A lo largo de este estudio, nos referimos a las niñas en el primer corte como niñas "de 6-8 años" o como niñas "prepuberales", ya que ninguna de ellas había comenzado el desarrollo

puberal. Para aludir a las niñas del segundo corte lo hacemos como niñas "de 13-16 años" o como "adolescentes", usando estas nomenclaturas de forma indistinta.

1.2. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO

El estudio Cuatro Provincias se inició como un estudio transversal, en el que se seleccionaron niños de 6-8 años mediante un muestreo aleatorio, estratificado y por conglomerados y en el que las unidades de análisis de referencia eran centros escolares públicos, concertados o privados de las provincias participantes. El muestreo tuvo dos etapas: en la primera etapa se seleccionaron los centros escolares a partir de los datos de la Delegación Provincial de Educación, que incluían el total de los colegios de cada provincia participante y, en la segunda etapa de muestreo se seleccionaron los alumnos.

Tras siete años, en un segundo corte del estudio, se volvieron a estudiar los niños incluidos en el primer corte del estudio que aceptaron participar de nuevo (un 30% de ellos), en ese momento con 13-16 años, incorporando nuevos niños de edades similares y de los mismos colegios.

2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PARA ESTUDIO BIOQUÍMICO

Los colaboradores de las distintas provincias (Prof. Ángel Gil en Madrid, Dr. Ovidio Fernández en Orense, Dr. Alipio Mangas y Dr. Alfonso Macías en Cádiz y Dr. Jacinto Fernández, y Prof. Alberto Torres en Murcia) se encargaron de solicitar autorización a la Delegación Provincial de Educación y al responsable del Área de Salud o equivalentes autonómicos para realizar el estudio. Una vez obtenido este permiso contactaron con las direcciones y asociaciones de padres de alumnos de los centros escolares seleccionados

para participar en el estudio y se les explicó el sentido y finalidad del mismo. Recibida la autorización por parte del colegio se realizó una presentación oral ante los padres de los niños seleccionados como candidatos al estudio, donde se les entregó una carta informativa y una autorización que tenían que firmar para que sus hijos pudieran participar en el estudio.

A los colegios se desplazaron enfermeras para realizar las extracciones y un equipo de campo, integrado por investigadores de nuestro grupo. Este personal estaba entrenado en la medición de peso y talla, y se encargaba de la manipulación y correcto almacenaje de las muestras de sangre hasta su llegada al laboratorio de referencia.

Para ser incluido en el estudio, cada niño tenía que acudir con la autorización firmada por el padre, madre o responsable legal. La extracción se llevó a cabo a primera hora de la mañana y tras 12 horas de ayuno. A cada niño se le extraía, con material desechable, sangre por venopunción en dos tubos Venoject® (Terumo), uno vacío de 3 ml y otro de 7 ml conteniendo EDTA-K₃ como anticoagulante.

Desde el momento de la extracción hasta su traslado al laboratorio para su análisis, las muestras permanecieron en hielo. Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 3000 rpm y 4°C. Tras la centrifugación del tubo que contiene el anticoagulante, se obtenía, en la fracción inferior, las células, que se trasvasaron a un tubo de vidrio reforzado que se congelaba a -70°C para posteriormente extraer el ADN. Se recogió la fracción superior (plasma) del tubo que contenía EDTA y la fracción superior (suero) del tubo sin EDTA. El plasma y el suero fueron alicuotados para las determinaciones bioquímicas.

En las provincias de Orense, Cádiz y Murcia las muestras se centrifugaron inmediatamente después de la extracción y las células, el plasma y el suero fueron guardados en criotubos,

congelándolas a -70°C hasta su transporte en nieve carbónica a nuestro laboratorio en Madrid. Las muestras se almacenaron en el Biobanco del IIS-Fundación Jiménez Díaz (RD90/0076/00101).

3. EDAD DE LA MENARQUIA

La edad de la menarquia se recogió a través del cuestionario cumplimentado por las niñas en el segundo corte del estudio, cuando tenían entre 13 y 16 años. De las niñas de las que no disponíamos de este dato en el cuestionario, bien por no haberlo rellenado, o bien porque en ese momento todavía no habían tenido el primer ciclo menstrual, se obtuvo el dato de su edad de la menarquia mediante una encuesta telefónica realizada en el año 2012, tras obtener el permiso por parte del Comité Ético de Investigación Clínica de la Fundación Jiménez Díaz ([anexo 1](#)).

En nuestro análisis se ha considerado la edad de la menarquia o bien en valor absoluto o bien por grupos, atendiendo al criterio de una distribución homogénea del número de niñas en cada categoría. Así, hemos considerado 3 grupos de edad de la menarquia: el **grupo 1** está constituido por las niñas con edad de la menarquia menor de 12 años, el **grupo 2** está formado por las niñas que tuvieron la menarquia con 12 años y el **grupo 3** está constituido por niñas con edad de la menarquia de 13 o más años.

4. DATOS ANTROPOMÉTRICOS

Los datos antropométricos al nacimiento (peso y longitud), se recogieron en los cuestionarios entregados a los padres, pidiéndoles que fueran rellenados consultando el informe clínico del nacimiento o el libro de salud del niño. En algunos casos este dato no fue cumplimentado. Así, los datos que faltaban se completaron mediante la encuesta

telefónica realizada en el año 2012. Se calcularon el z-score del peso al nacimiento según tablas de referencia²¹⁸ y el índice ponderal al nacimiento según la siguiente fórmula: peso (g) /longitud (cm)³ x 100. Considerando el índice ponderal, se han dividido las niñas en tres grupos, atendiendo a los valores 2,44 y 3,05 g/cm³ que corresponden a los percentiles 10 y 90 para las niñas a término, atendiendo a datos de alguna bibliografía revisada²¹⁹.

A la edad de 6-8 años, en el primer corte, se obtuvieron de cada niña las medidas del peso y la talla. En el segundo corte, cuando las niñas tenían entre 13 y 16 años, se midieron el peso, talla, perímetro abdominal, circunferencia de la cadera y la cantidad y porcentaje de masa grasa. Todas las medidas se realizaron con las niñas vestidas con ropa ligera y sin zapatos.

El peso se midió hasta el último 0,1 kg con una balanza electrónica digital homologada y la talla se midió hasta el último milímetro con un estadiómetro portátil. El IMC se obtuvo mediante la fórmula: peso(kg)/talla(m)² y el z-score del IMC se calculó de acuerdo a valores de referencia (tabla 1) según la edad en población infantil española²¹⁸.

Tabla 1. Valores de IMC expresados como media y desviaciones estándar para las edades de las niñas del estudio según las tablas de Carrascosa 2008.

EDAD (años)	IMC (kg/m ²)	
	Media	DE
6	16,30	2,21
6,5	16,58	2,32
7	16,60	2,45
7,5	17,15	2,64
8	17,49	2,91

EDAD (años)	IMC (kg/m ²)	
	Media	DE
13	20,97	4,17
13,5	21,16	3,89
14	20,81	3,64
14,5	21,32	3,59
15	21,38	3,81
15,5	21,51	3,05
16	21,77	3,53

Nuestra población fue categorizada en función de su IMC y edad en niñas con normopeso (NP), sobrepeso (SB) u obesidad (OB) de acuerdo a los puntos de corte propuestos por *Cole y col*, (tabla 2), en una síntesis de estudios internacionales y asumidos por la IOTF (*International Obesity Task Force*)²²⁰. Para el mejor análisis e interpretación de los datos, atendiendo al tamaño muestral y a la subcategorización de las variables, nos ha parecido adecuado unificar las niñas que cumplen criterios de sobrepeso (SB) y las niñas que cumplen criterios de obesidad (OB) en un grupo que aparecerá a lo largo de este trabajo como sobrepeso y obesidad (SB+OB).

Tabla 2. Puntos de corte internacionales de IMC propuestos por *Cole y colaboradores* para las edades de las niñas de este estudio (tomado de referencia 220).

EDAD (años)	SOBREPESO IMC > 25 Kg/m ²	OBESIDAD IMC > 30 Kg/m ²
6	17,3	19,7
6,5	17,5	20,1
7	17,8	20,5
7,5	18	21
8	18,3	21,6
13	22,6	27,8
13,5	23	28,2
14	23,3	28,6
14,5	23,7	28,9
15	23,9	29,1
15,5	24,2	29,3
16	24,4	29,4

La circunferencia de la cintura (cm) se midió en la línea media entre el margen costal inferior y la cresta ilíaca a nivel de la espina ilíaca anteroposterior (con estimación de 0,5 cm). La circunferencia de la cadera (cm) se determinó a nivel de los trocánteres mayores. El

z-score de la circunferencia de la cintura se calculó de acuerdo a valores de referencia en función de la edad en población infantil (tabla 3)²²¹.

Tabla 3. Percentiles de cintura para niñas europeas (tomado de referencia 221)

Edad (años)	Cintura		
	P 25	P50	P75
6	51,8	55	58,8
7	53,5	56,9	61,1
8	55,2	58,8	63,4
13	63,6	68,2	74,9
14	65,3	70,1	77,2
15	67	72	79,5
16	68,6	73,9	81,8

El peso en kg de la masa grasa y el porcentaje de la masa grasa corporal se midieron con un analizador de la composición corporal (Tanita TBF-300M, Arlington Heights, IL) mediante impedancia bioeléctrica, que valora la resistencia intrínseca del cuerpo al paso de corriente eléctrica. El músculo actúa como conductor de la corriente mientras que el tejido adiposo opone resistencia al paso de corriente. Para realizar estas medidas se introducían previamente los datos de sexo, edad y talla de las niñas. El aparato es capaz de medir un porcentaje de grasa corporal entre el 1 y el 75%.

5. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

En las muestras de suero almacenadas determinamos los niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina. Disponíamos de muestra suficiente para determinar estas variables en 168 de las 195 niñas de las niñas de nuestro estudio, niñas que habían participado en los dos cortes del estudio Cuatro Provincias y de las que conocíamos la edad de la menarquia.

5.1. DETERMINACIÓN DE LEPTINA

Los niveles de leptina se determinaron en suero mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) tipo *õsandwichö* (EIA-2395, DRG Instruments GmbH, Germany). Los pocillos de la placa están cubiertos de un anticuerpo monoclonal específico para la leptina. Tras introducir las muestras de suero se añade el anticuerpo secundario biotinilado, específico para un antígeno de la molécula de leptina. La biotina reacciona posteriormente con un conjugado de estreptavidina peroxidasa que produce una reacción colorimétrica al reaccionar con el sustrato, proporcional a la concentración de hormona en la muestra. Las concentraciones de la molécula se calculan a partir de las curvas patrón generadas a partir de las concentraciones de los estándares incluidos en cada ensayo. El rango de determinación está entre 1-100 ng/ml y el límite de detección es de 1 ng/ml.

5.2. DETERMINACIÓN DE ADIPONECTINA

Los niveles de adiponectina se cuantificaron en suero con un kit comercial de ELISA tipo *õsandwichö* (E09, Mediatech GmbH, Reutlingen, Germany) mediante el empleo de dos anticuerpos de alta afinidad. En un primer paso, la adiponectina se une al primer anticuerpo que recubre los pocillos y posteriormente se une a un anticuerpo biotinilado anti-adiponectina, la biotina reacciona con un conjugado de estreptavidina peroxidasa que produce una reacción colorimétrica al reaccionar con el sustrato, proporcional a la concentración de este péptido en la muestra. Las concentraciones de la molécula se calculan a partir de las curvas patrón generadas a partir de las concentraciones de los estándares incluidos en cada ensayo. El rango de determinación está entre 0-100 ng/ml y el límite de detección es de 0,6 ng/ml.

5.3. DETERMINACIÓN DE INSULINA

La medición de las concentraciones de insulina se realizó mediante un ensayo inmunorradiométrico (IRMA) de dos lugares de unión (Bio-Rad). El IRMA es un ensayo no competitivo en el que el analito analizado se une a dos anticuerpos entre los que queda comprendido a modo de *“sandwich”*. El primer anticuerpo monoclonal se encuentra fijado a la pared interna de los tubos. El otro anticuerpo también monoclonal se marca radiactivamente con I^{125} para que pueda ser detectado. El analito presente en las muestras problema, los estándares y los controles se unen a ambos anticuerpos formando un complejo tipo *“sandwich”*. El reactivo que no se haya unido se elimina mediante decantación y lavado de los tubos. El I^{125} emite una radiación tipo gamma, la cantidad de esta radiación se cuantifica en un contador gamma y de este modo se obtiene la concentración de insulina que contiene el suero de cada individuo.

5.4. DETERMINACIÓN DE GRELINA

Los niveles de grelina se determinaron mediante ensayos Bio-Plex® (Bio-PlexPro™ Human Diabetes Standard 3-Plex; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), que permiten la detección simultánea de múltiples analitos en un mismo pocillo en placas de 96 pocillos. Las determinaciones se realizaron en un equipo Luminex 200 System (Luminex Corporation, Invitrogen; Caramillo, CA, USA).

Utilizamos un ensayo Bio-Plex® (Bio-PlexPro™ Human Diabetes) diseñado específicamente para nuestro estudio y que incluía la determinación de grelina, visfatina y resistina. El ensayo contiene 3 clases de *“beads”* microesferas, cada una de ellas con diferentes proporciones de dos fluorocromos en su interior, que al ser excitados por el láser

del equipo de análisis, emiten diferentes señales lo que permite identificar las moléculas por separado.

El ensayo de la técnica de Luminex es similar al de un ELISA. Los anticuerpos (anticuerpos de captura) dirigidos contra el biomarcador deseado (molécula diana), se unen covalentemente a las microesferas magnéticas marcadas con fluorescencia. Las microesferas reaccionan con la muestra que contiene el biomarcador de interés. Después de varios lavados para eliminar la proteína no unida, se añade a la reacción un anticuerpo específico de detección biotinilado que se une a otro epítipo del biomarcador (en un sitio diferente al del anticuerpo de captura). Se añade el complejo estreptavidina-ficoeritrina que se une a los anticuerpos de detección biotinilados en la superficie de las microesferas. La ficoeritrina actúa como un indicador de fluorescencia o reporter.

El análisis de los datos obtenidos por el sistema de Luminex (que es un láser dual) se recoge por un sistema lector de flujo que lee la placa. El contenido de los pocillos se lleva al lector. Los láseres y las fibras ópticas asociadas detectan la fluorescencia interna de cada microesfera para identificar el ensayo particular, es decir, para discriminar qué tipo de biomarcador está analizando. También detectan la señal fluorescente en la superficie de la microesfera de la ficoeritrina, esto señala los niveles de biomarcador que existen en la muestra. Un procesador digital de señales da salida a los datos, que son analizados y presentados como intensidad de fluorescencia y concentración en el software Bio-Plex Manager[®] (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las concentraciones de cada molécula se calculan a partir de las curvas patrón generadas a partir de las concentraciones de los estándares de los calibradores para cada una de ellas, incluidos en cada ensayo de acuerdo al protocolo del kit (Bio-PlexPro[™] Human Diabetes Standard 3-Plex; Bio-Rad).

El rango de detección del ensayo Bio- Plex Pro human diabetes para la grelina se encuentra entre 16,6 y 8502 pg/ml y la sensibilidad del ensayo (límite de detección) es de 1,2 pg/ml.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS versión 15.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL).

En la fase descriptiva se sistematizó la distribución de las variables de interés en nuestra población, de modo que se calcularon medias e intervalos de confianza al 95% para las variables cuantitativas. Para el estudio comparativo de valores medios de las variables bioquímicas entre las dos edades se empleó un test de comparación de muestras pareadas.

Se realizó un test de comparación de medias de la edad de la menarquia entre los grupos de normopeso y exceso de peso.

Se utilizó el test de Chi cuadrado para comparar frecuencias de las niñas en cada uno de los grupos de edad de la menarquia entre las provincias.

La normalidad de las variables se comprobó mediante el test de Kolgomorov-Smirnov. Se realizaron correlaciones de la edad de la menarquia con las variables antropométricas y las variables bioquímicas así como correlaciones entre las variables antropométricas y bioquímicas. Se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson cuando ambas variables tenían una distribución normal y el coeficiente de correlación de Spearman cuando alguna de las variables no tenía una distribución normal. También se efectuaron correlaciones parciales controladas por edad, IMC o niveles de leptina de variables antropométricas y variables bioquímicas con la edad de la menarquia.

Se utilizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) para comparar las variables bioquímicas y antropométricas en función de las categorías de edad de la menarquia y para comparar la edad de la menarquia en función de las categorías de cambio de peso entre las distintas edades analizadas en el estudio. También se utilizó el test de ANOVA para comparar la edad de la menarquia y parámetros bioquímicos en función de los terciles de leptina. Cuando encontramos diferencias significativas, siendo las varianzas iguales, realizamos un post hoc de Tukey, y si las varianzas no eran iguales realizamos un post hoc de Games-Howell.

El análisis de regresión múltiple se realizó con la edad de la menarquia como variable dependiente. Como variables independientes se eligieron aquellas que en el análisis univariante habían sido significativas. Dada la colinealidad existente entre el IMC y algunas de las variables bioquímicas en el modelo, se ajustó el análisis por el IMC.

7. LIMITACIONES

Una de las debilidades del estudio podría ser el método utilizado para evaluar la edad de la menarquia, en el que puede intervenir un sesgo de memoria. Consideramos que la edad de la menarquia es un evento importante en la vida de una mujer, lo que mitiga un poco este punto. Además, el tiempo transcurrido entre la aparición de la menarquia y el tiempo de recogida de datos (ya sea el cuestionario o la llamada telefónica) siempre ha sido menor de 5 años, lo cual también empequeñece este posible error.

Otra limitación de este estudio es la ausencia de datos del estadio de desarrollo puberal de *Tanner* en las niñas del segundo corte. Para tratar de paliar esta limitación, al menos en parte, los análisis llevados a cabo con los parámetros bioquímicos en el segundo corte del estudio se ajustaron por la edad.

También vemos como limitación del estudio la ausencia de datos de la menarquia en las madres de las niñas participantes, así como la ausencia de datos de perímetro de la cintura y cantidad de masa grasa en las niñas a la edad de 6-8 años.

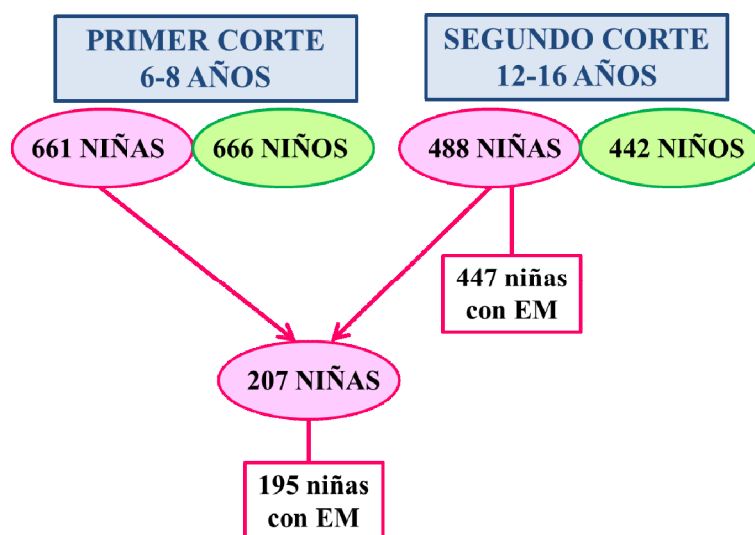
Resultados

1. DESCRIPCION DE LA MUESTRA

La población de este trabajo está constituida por las 195 niñas que participaron en los dos cortes del Estudio Cuatro Provincias de las cuales teníamos información sobre la edad de la menarquia.

El número de niños que participaron en el Estudio Cuatro Provincias en ambos cortes, así como el número de niñas de las que disponemos del dato de la edad de la menarquia se muestra en la [figura 7](#). En un primer corte del estudio participaron 661 niñas de entre 6 y 8 años, y en un segundo corte participaron 448 niñas que tenían entre 12 y 16 años. 207 niñas participaron en ambos cortes del estudio (en el primer corte cuando tenían entre 6 y 8 años y, posteriormente, en el segundo corte del estudio, con 13-16 años de edad).

Figura 7. Número de niños participantes en el estudio Cuatro Provincias y número de niñas de las que disponemos de la edad de la menarquia (EM).



En el segundo corte del estudio se recogió información sobre de la edad de la menarquia en el cuestionario que se les entregaba a las niñas participantes y a sus familiares junto con el consentimiento informado. En los casos en los que este dato no fue recogido inicialmente (bien porque todavía no habían tenido el primer ciclo menstrual o bien por ausencia de

respuesta en este punto del cuestionario), la información se consiguió posteriormente mediante llamada telefónica. Así, de las 488 niñas que participaron en esta parte del estudio, obtuvimos datos de la edad de la menarquia en 447 niñas. De ellas, 195 también habían participado en el primer corte del estudio, y son las que constituyen la población principal de este trabajo.

1.1. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS AL NACIMIENTO

Los datos antropométricos al nacimiento fueron recogidos en los cuestionarios entregados a las niñas y sus familiares en ambos cortes del estudio. Estos datos fueron completados posteriormente mediante llamada telefónica.

En la [tabla 4](#) se describen las características antropométricas al nacimiento (peso, z-score del peso para la edad gestacional e índice ponderal) de las niñas de nuestro estudio. Disponemos de los datos antropométricos al nacimiento en 166 de las 195 niñas que participaron en dos cortes del estudio (85% de ellas). Las medias de estos datos perinatales en las niñas de nuestro estudio no difieren de las medias de estas mismas variables en la población global, que incluye a 447 niñas.

Tabla 4. Datos antropométricos al nacimiento [media (intervalo de confianza al 95%)].

PRN (g)	PRNz-score	Índice ponderal (g/cm ³)
3250 (3174-3327)	0,06 (-0,10-0,21)	2,54 (2,49-2,59)

PRN: peso de recién nacido

1.2. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS EN LA INFANCIA Y EN LA ADOLESCENCIA

Las variables antropométricas a la edad prepuberal y en la adolescencia de las 195 niñas del estudio se muestran en la [tabla 5](#). En las niñas del segundo corte disponemos además de los datos de la circunferencia de la cintura y del perímetro de la cadera y, en algunas de ellas, también tenemos información sobre la cantidad de masa grasa, tanto en valor absoluto como en porcentaje ([tabla 6](#)). Las medias de estas variables antropométricas en el subgrupo de las 195 niñas de nuestro trabajo no son diferentes de las obtenidas en todas las niñas analizadas en el estudio en cada uno de los cortes.

Tabla 5. Datos antropométricos de las niñas en la edad prepuberal y en la adolescencia [media (intervalo de confianza al 95%)].

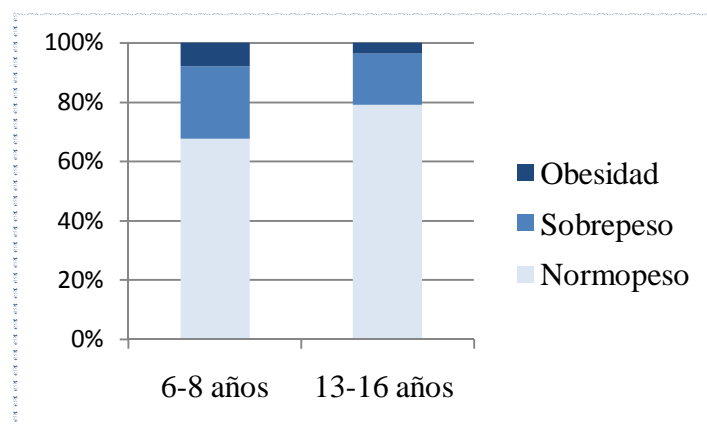
	PRIMER CORTE (6-8 años)	SEGUNDO CORTE (13-16 años)
Edad (años)	7,23 (7,14-7,32)	14,61 (14,52-14,73)
Peso (kg)	27,16 (26,38-27,94)	57,16 (55,78-58,54)
Talla (cm)	125,9 (124,8-126,9)	161,9 (161,0-162,8)
IMC (kg/m²)	17,06 (16,70-17,41)	21,77 (21,31-22,22)
IMC z-score	0,07 (-0,08-0,21)	0,13 (-0,01-0,26)

Tabla 6. Perímetro de cintura (valor absoluto y z-score), perímetro de cadera y masa grasa (cantidad y porcentaje) de las 195 niñas en la adolescencia [media (IC al 95%)].

Perímetro cintura (cm) n= 195	Cintura z-score n= 195	Perímetro cadera (cm) n= 195	Masa grasa (kg) n= 82	Masa grasa (%) n= 82
73,51 (72,25-74,78)	0,16 (0,07-0,26)	94,32 (93,29-95,36)	16,96 (15,55-18,40)	28,47 (27,04-29,91)

El porcentaje de niñas con normopeso, sobrepeso y obesidad según los puntos de corte de Cole por edades²²⁰, se muestran en la [figura 8](#). El porcentaje de niñas con exceso de peso, incluyendo en este grupo las niñas con sobrepeso y con obesidad es del 32,3% en las niñas a la edad prepuberal y del 21 % en la adolescencia, porcentaje que no difiere del observado en el grupo total de cada una de las edades.

Figura 8. Prevalencia de normopeso, sobrepeso y obesidad en nuestra población.



El rango del z-score del IMC para las niñas del primer corte es de -1,8 a 3 SDS y en la edad adolescente es de -1,97 a 4,6 SDS. En la edad prepuberal no hay ninguna niña con desnutrición moderada ni grave, y el porcentaje de niñas con desnutrición leve es del 5%. En la adolescencia ninguna niña presenta una desnutrición grave, sólo una niña (0,5%) presenta una desnutrición moderada y un 5% de ellas presentaban una desnutrición leve.

1.3. NIVELES DE LEPTINA, ADIPONECTINA, INSULINA Y GRELINA A AMBAS EDADES

En 168 de las 195 niñas integrantes de este estudio pudimos determinar los niveles de leptina, adiponectina e insulina a ambas edades. El número de niñas de las que disponemos de los niveles de grelina en los dos cortes es de 102.

Los niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina en ambos cortes se muestran en la [tabla 7](#). Como se observa en esta tabla, los niveles de leptina e insulina fueron significativamente más altos a la edad de 13-16 años que a la edad de 6-8 años. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de adiponectina en la edad prepuberal y en la adolescencia. Los niveles de grelina fueron significativamente más bajos a la edad de 13-16 años que a la edad de 6-8 años.

Tabla 7. Niveles de las variables bioquímicas de las niñas del estudio en la edad prepuberal y a los 13-16 años [media (intervalo de confianza al 95%)]

	PRIMER CORTE (6-8 años)	SEGUNDO CORTE (13-16 años)	<i>p</i>
Leptina (ng/ml)	5,85 (5,12-6,57)	17,79 (16,05-19,54)	<0,001
Adiponectina (µg/ml)	15,78 (14,72-16,84)	16,93 (15,61-18,25)	0,081
Insulina (mUI/ml)	3,59 (3,18-3,99)	8,59 (7,73-9,46)	<0,001
Grelina (pg/ml)	478 (409-547)	342 (300-385)	<0,001

p: comparación de muestras pareadas

2. EDAD DE LA MENARQUIA

De las 447 niñas del segundo corte de las que disponemos de la edad de la menarquia, en el momento en el que fueron analizadas a los 13-16 años, habían tenido ya el primer ciclo menstrual 441 niñas, el 92% de ellas, y no lo habían tenido todavía 36 niñas, un 8% de ellas. La media de la edad de la menarquia de estas 447 niñas fue de 12,07 años (intervalo de confianza al 95% de 11,96-12,17).

De las 195 niñas de nuestro estudio, inicialmente estudiadas entre los 6 y los 8 años, en fase prepuberal, y posteriormente reevaluadas siete años más tarde, cuando tenían entre 13 y 16 años, habían tenido ya la menarquia en el momento de la segunda evaluación 186 niñas (un 95,4%). La media de la edad de la menarquia en esta población es 12,08 años (intervalo de confianza al 95% de 11,92 a 12,24), cifra que no es diferente de la media de la edad de la menarquia en el conjunto total de las niñas integrantes del segundo corte del estudio.

Si analizamos la edad de la menarquia por provincias en el conjunto total de las niñas (tabla 8), no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la edad de la menarquia entre provincias, aunque sí se observa que en Cádiz la edad de la menarquia es ligeramente menor que en el resto de provincias.

Tabla 8. Edad de la menarquia según la provincia de origen de todas las niñas del segundo corte [media (intervalo de confianza al 95%)]

	MADRID n=190	ORENSE n=77	CÁDIZ n=83	MURCIA n=97	ANOVA
Menarquia (años)	12,14 (11,99-12,30)	12,08 (11,82-12,33)	11,78 (11,49-12,07)	12,15 (11,92-12,34)	0,084

En nuestro análisis se ha considerado la edad de la menarquia o bien en valor absoluto o bien por grupos, atendiendo al criterio de una distribución homogénea del número de niñas en cada categoría. Así, hemos considerado 3 grupos de edad de la menarquia cuya

distribución se muestra en la [tabla 9](#). La distribución de frecuencias entre estos diferentes grupos de edad de la menarquia es similar en el conjunto de las niñas del segundo corte y en el subconjunto de niñas integrantes de este estudio.

Tabla 9. Número y frecuencia de niñas en cada uno de los grupos de edad de la menarquia considerados para el análisis.

	Grupo 1 EM < 12 años	Grupo 2 12 ÷ EM <13	Grupo 3 EM ≥ 13 años
n=195 (Niñas de este estudio)	57 (29,2%)	73 (37,4%)	65 (33,3%)
n=447 niñas (Total niñas estudio 4P)	135 (30,2%)	167 (37,4%)	145 (32,4%)

EM: edad de la menarquia, Estudio 4P: estudio Cuatro Provincias

Al analizar por provincias la frecuencia de niñas del conjunto de la población en cada grupo de edad de la menarquia establecido ([tabla 10](#)), se observa un porcentaje mayor de las niñas con edades de la menarquia inferiores a 12 años en la provincia de Cádiz. Al comparar este porcentaje (frecuencia de niñas en el grupo 1) en Cádiz, con el porcentaje de niñas en este grupo 1 en el resto de las provincias, observamos diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de Cádiz y Madrid (p 0,015).

Tabla 10. Porcentaje (número) de niñas de Madrid, Orense, Cádiz y Murcia en los diferentes grupos de edad de la menarquia.

	MADRID n=190 niñas	ORENSE n=77 niñas	CÁDIZ n=83 niñas	MURCIA n=97 niñas
Grupo 1 EM < 12 años	26,8% (51)	27,3% (21)	42,2% (35)	28,9% (28)
Grupo 2 12 ÷ EM <13 años	39,5 (75)	44,2% (34)	25,3% (21)	38,1% (37)
Grupo 3 EM ≥ 13 años	33,7% (64)	28,6% (22)	32,5% (27)	33% (32)

3. DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y EDAD DE LA MENARQUIA

En nuestra población hemos analizado la relación entre la edad de la menarquia y las variables antropométricas al nacimiento, a la edad prepuberal y en la adolescencia, así como su relación con los cambios de estas variables antropométricos entre ambas edades.

3.1. DATOS PERINATALES Y EDAD DE LA MENARQUIA

No hemos observado correlación significativa entre la edad de la menarquia y los datos antropométricos al nacimiento que (tabla 11). La correlación tampoco se observa si realizamos el análisis en el grupo total de las niñas del segundo corte del estudio.

Tabla 11. Correlación de Spearman de los datos antropométricos al nacimiento con la edad de la menarquia (n=166 niñas).

	PRN	PRNz-score	Índice Ponderal
Edad menarquia	-0,030	-0,010	-0,026

PRN: peso recién nacido

Considerando el índice ponderal, se han dividido las niñas en tres grupos, atendiendo a los valores 2,44 y 3,05 g/cm³ que corresponden a los percentiles 10 y 90 para las niñas a término²¹⁹, y se ha comparado la edad de la menarquia en cada uno de los grupos, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (tabla 12). Como muestra dicha tabla se observa una tendencia a una edad de la menarquia ligeramente más tardía en las niñas con índice ponderal mayor del percentil 90; no obstante, el tamaño muestral de este grupo impide sacar conclusiones y extrapolar resultados. Tampoco observamos diferencias cuando hacemos este mismo análisis en el conjunto total de niñas.

Tabla 12. Análisis de la edad de la menarquia según índice ponderal (IP) al nacimiento.

	IP $\leq 2,44$ n=57	$2,44 < \text{IP} < 3,05$ n=100	IP $\geq 3,05$ n=9	ANOVA
Edad menarquia	12,04 (11,75-12,34)	12,08 (11,85-12,31)	12,39 (11,68-13,10)	0,697

ANOVA: análisis de la varianza. IP: índice ponderal (g/cm^3)

3.2. DATOS ANTROPOMÉTRICOS A LOS 6-8 AÑOS Y EDAD DE LA MENARQUIA

El análisis de correlación entre la edad de la menarquia y las variables antropométricas a los 6-8 años mostró una asociación significativa negativa de la edad de la menarquia con el peso, el IMC y el z-score del IMC, como se observa en la [tabla 13](#).

Tabla 13. Correlación de Spearman de la edad de la menarquia con los datos antropométricos a los 6-8 años.

	Edad menarquia
Peso	-0,227**
Talla	-0,132
IMC	-0,240**
IMC z-score	-0,253**

** $p < 0,01$

Cuando analizamos las variables antropométricas a los 6-8 años en función de las categorías de edad de la menarquia definidas para el análisis en nuestro estudio, se observa que niñas con edad de la menarquia más temprana (menor de 12 años) tenían un peso y un IMC significativamente mayor que las niñas con la edad de la menarquia más tardía (con 13 o más años), como queda reflejado en la [tabla 14](#).

Tabla 14. Variables antropométricas en niñas prepuberales según los grupos de edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)]

	Grupo 1 EM < 12 años n=57	Grupo 2 12 ÖEM <13 años n=73	Grupo 3 EM × 13 años n=65	p	
				ANOVA	Post Hoc ^a
Peso (kg)	28,25 (26,86-29,65)	27,42 (25,99-28,85)	25,58 (24,48-26,68)	0,018	1-3*
IMC (Kg/m²)	17,66 (17,05-18,27)	17,19 (16,54-17,84)	16,37 (15,82-16,91)	0,014	1-3*
IMC z-score	0,30 (0,06-0,55)	0,13 (-0,13-0,40)	-0,23 (-0,44- -0,01)	0,01	1-3**

a) pTukey post Hoc: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. ANOVA: análisis de la varianza

Al analizar las medias de la edad de la menarquia en función de la categoría de peso según los criterios de *Cole y col*²²⁰, se observa que, aunque la media de la edad de la menarquia sea menor en el grupo de las niñas con sobrepeso y con obesidad (SB+OB) respecto a las niñas con normopeso, esta diferencia no alcanza significación estadística (tabla 15).

Tabla 15. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en función de los grupos de categoría de peso a los 6-8 años.

	NORMOPESO n= 132	SB+OB N = 63	p
Menarquia (años)	12,17 (11,94-12,40)	11,87 (11,59-12,16)	0,139

SB: sobrepeso, OB: obesidad

3.3. DATOS ANTROPOMÉTRICOS A LOS 13-16 AÑOS Y EDAD DE LA MENARQUIA

Cuando analizamos en nuestra población la relación de la edad de la menarquia con las variables antropométricas a los 13-16 años, se observa una correlación negativa significativa entre la edad de la menarquia y el peso, el IMC, el z-score del IMC, la

circunferencia de la cintura, el z-score de la circunferencia de la cintura, la circunferencia de la cadera y la cantidad de masa grasa tanto en valor absoluto como en porcentaje (tabla 16). Al realizar este mismo análisis con el conjunto total de las niñas se obtienen los mismos resultados.

Tabla 16. Correlación de Spearman de los datos antropométricos a los 13-16 años con la edad de la menarquia.

	Edad de la menarquia
Peso	-0,307**
Talla	-0,035
IMC	-0,334***
IMC z-score	-0,348***
Perímetro cintura	-0,182*
Cintura z-score	-0,202**
Cadera	-0,343***
Masa grasa (kg)	-0,417***
Masa grasa (%)	-0,401***

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Además, cuando clasificamos a las niñas en función de la edad de la menarquia observamos diferencias significativas en las diferentes variables antropométricas entre niñas del grupo 1 (menarquia antes de los 12 años) y las niñas del grupo 3 (menarquia con 13 o más años), de forma que las niñas con edad de la menarquia más temprana tenían niveles medios mayores significativos de IMC, z-score del IMC, perímetro de la cintura, z-score del perímetro de la cintura, circunferencia de la cadera y de la cantidad de masa grasa tanto en valor absoluto como en porcentaje. Estos datos quedan reflejados en la tabla 17.

Tabla 17. Variables antropométricas en niñas del segundo corte según los grupos de edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)].

	GRUPO 1 EM < 12 años n=57	GRUPO 2 12 ÷ EM < 13 años n=73	GRUPO 3 EM ≥ 13 años n=65	p	
				ANOVA	PostHoc
IMC (Kg/m²)	22,98 (22,15-23,81)	21,94 (21,15-22,72)	20,52 (19,85-21,19)	0,000	1-3***
IMC z-score	0,47 (0,25-0,69)	0,19 (-0,02-0,41)	-0,23 (-0,42--0,04)	0,000	1-3*** 2-3*
Cintura (cm)	75,63 (73,02-78,25)	73,6 (71,43-75,78)	71,55 (69,74-73,36)	0,042	1-3*
Cintura z-score	0,31 (0,139-0,49)	0,19 (0,02-0,36)	0,002 (-0,13-0,137)	0,029	1-3*
Cadera (cm)	97,25 (95,37-99,12)	95,21 (93,51-96,91)	90,76 (89,25-92,28)	0,000	1-3*** 2-3**
Masa grasa (%)	32,85 (30,27-35,42)	26,9 (24,98-28,82)	26,1 (23,91-28,35)	0,000	1-2** 1-3***
Masa grasa (kg)	21,37 (18,33-24,40)	15,48 (13,93-17,02)	14,56 (12,6-16,51)	0,000	1-2** 1-3***

ANOVA: análisis de la varianza. Post Hoc: Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Al considerar en este mismo análisis a todo el conjunto de las niñas del segundo corte, las diferencias entre grupos son aún más consistentes para el IMC y para el z-score del IMC, en los que también se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 2 de edad de la menarquia y entre los grupos 2 y 3 de la edad de la menarquia.

Al analizar las medias de la edad de la menarquia en función de la categoría de peso de las adolescentes se observa que las niñas del grupo sobrepeso y obesidad (SB+OB) tienen menarquias significativamente más tempranas que las niñas con normopeso a esa edad (tabla 18). Cuando hacemos este mismo análisis en el conjunto total de niñas obtenemos los mismos resultados.

Tabla 18. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en función de la categoría de peso a la edad de 13-16 años.

	NORMOPESO n=154	SB+OB n=41	<i>p</i>
Menarquia (años)	12,28 (12,12-12,45)	11,32 (10,97-11,67)	0,000

SB: sobrepeso, OB: obesidad

3.4. EVOLUCIÓN DEL IMC DESDE LA EDAD PREPUBERAL A LA ADOLESCENCIA Y EDAD DE LA MENARQUIA

A ambas edades, las niñas que presentaban sobrepeso u obesidad tenían una edad de la menarquia más temprana que las niñas con normopeso (tablas 15 y 18), siendo esta diferencia estadísticamente significativa a la edad de 13-16 años. A ambas edades, las niñas con menarquias más tempranas tenían un IMC significativamente mayor que las niñas con la edad de la menarquia más tardía, como ha quedado reflejado en las tablas 14 y 17.

Así, nos ha parecido importante estudiar si la variación en la categoría de peso (normopeso o sobrepeso más obesidad) entre ambas edades tiene influencia sobre la edad de la menarquia. Con este objetivo, se clasificaron las niñas en función de los cambios longitudinales observados de la categoría de peso usando los criterios de *Cole y col.* en función de la edad, formándose cuatro grupos, los cuales se definen a continuación:

- **Grupo 1** → niñas con normopeso en el primer corte y que seguían con normopeso en el segundo corte (**NP→NP**). Constituido por 118 niñas.
- **Grupo 2** → niñas que tenían normopeso en el primer corte y que en el segundo corte tenían sobrepeso u obesidad (**NP→SP+OB**). Formado por 14 niñas.
- **Grupo 3** → niñas con sobrepeso u obesidad en ambos cortes (**SP+OB→SP+OB**). Formado por 36 niñas.

- **Grupo 4** → niñas que tenían sobrepeso u obesidad en el primer corte y que en el segundo corte tenían normopeso (**SP+OB→NP**). Constituido por 27 niñas.

De esta forma, como queda reflejado en la [tabla 19](#), se observaron edades de la menarquia significativamente más tempranas en las niñas que tenían sobrepeso u obesidad a los 13-16 años de edad (grupo 2 [NP→SP+OB] y grupo 3 [SP+OB→SP+OB]). La menor edad de la menarquia se objetivó en las niñas que habían cambiado de categoría de peso entre las dos edades pasando de normopeso a sobrepeso u obesidad entre su edad prepuberal y su adolescencia (grupo 2 [NP→SP+OB]), presentando una edad de la menarquia media de 10,98 años. Las niñas que se mantenían con normopeso desde la infancia a la adolescencia (grupo 1 NP→ NP) son las que tienen la edad de la menarquia más tardía (medias de edad de la menarquia de 12,32 años).

Tabla 19. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas clasificadas en función del cambio de categoría de peso entre ambas edades.

Grupo 1 NP→NP	Grupo 2 NP→SP+OB	Grupo 3 SP+OB→NP	Grupo 4 SP+OB→SP+OB	<i>p</i>	
				ANOVA	Post Hoc
12,32 (12,09-12,54)	10,98 (10,24-11,72)	12,25 (11,89-12,54)	11,43 (10,97-11,89)	0,000	1-2** 1-4** 2-3** 3-4*

NP: peso normal para la edad. SP + OB: niñas con sobrepeso y obesidad.

ANOVA: análisis de la varianza. Post Hoc: Tukey, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

3.5. EVOLUCIÓN DE LOS DATOS ANTROPOMÉTRICOS DESDE EL NACIMIENTO A LA EDAD PREPUBERAL Y A LA ADOLESCENCIA Y EDAD DE LA MENARQUIA

Considerando un valor de índice ponderal de $2,44 \text{ g/cm}^3$, correspondiente al percentil 10 de las niñas nacidas a término, se han establecido dos grupos de categoría de índice ponderal: por debajo y por encima de $2,44 \text{ g/cm}^3$. Con estos dos grupos pertenecientes al periodo

neonatal y con los grupos de categoría de peso (NP y SP+OB) correspondientes a la etapa prepuberal y a la adolescencia, se han establecido cuatro grupos de cambio de categoría de peso entre el nacimiento y la edad prepuberal y cuatro grupos de cambio de categoría de peso desde el nacimiento a la adolescencia, y se ha comparado la edad de la menarquia entre estos grupos. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la edad de la menarquia entre las niñas de los grupos correspondientes a cada uno de los cambios de categoría de peso entre el nacimiento y la edad prepuberal (tabla 20), pero sí se han visto diferencias estadísticamente significativas en la edad de la menarquia entre grupos correspondientes a cambios de categoría de peso entre el nacimiento y la adolescencia (tabla 21).

Tabla 20. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas en función del cambio de categoría de IP y de peso entre el nacimiento y los 6-8 años.

Grupo 1 IP $\leq 2,44 \rightarrow$ NP n = 42	Grupo 2 IP $\leq 2,44 \rightarrow$ SP+OB n = 15	Grupo 3 IP $> 2,44 \rightarrow$ NP n = 73	Grupo 4 IP $> 2,44 \rightarrow$ SP+OB n = 36	ANOVA
12,06 (11,68-12,44)	12,01 (11,45-12,57)	12,23 (11,92-12,24)	11,87 (11,50-12,24)	0,568

IP: índice ponderal (g/cm^3). NP: normopeso. SP+OB: sobrepeso y obesidad

Tabla 21. Edad de la menarquia [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas en función del cambio de categoría de IP y de peso entre el nacimiento y los 13-16 años.

Grupo 1 IP $\leq 2,44 \rightarrow$ NP n = 47	Grupo 2 IP $\leq 2,44 \rightarrow$ SP+OB n = 10	Grupo 3 IP $> 2,44 \rightarrow$ NP n = 83	Grupo 4 IP $> 2,44 \rightarrow$ SP+OB n = 23	<i>p</i>	
				ANOVA	PostHoc
12,24 (11,95-12,54)	11,10 (10,31-11,88)	12,30 (12,06-12,53)	11,49 (11,05-11,93)	0,000	1-2** 1-4* 2-3* 3-4*

IP: índice ponderal (g/cm^3). NP: normopeso. SP+OB: sobrepeso y obesidad.

a) *p* Tukey post Hoc: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

4. RELACIÓN DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS CON LOS DATOS ANTROPOMÉTRICOS

Mediante un análisis de correlación se ha evaluado la asociación de las variables antropométricas con las variables bioquímicas analizadas en este estudio.

4.1. EDAD PREPUBERAL

En niñas prepuberales existe una correlación significativa entre el IMC y el z-score del IMC y los niveles de leptina, adiponectina e insulina, siendo el coeficiente de correlación muy elevado para la leptina. No se objetiva correlación entre variables antropométricas con los niveles de grelina (tabla 22).

Tabla 22. Correlación de Spearman entre el IMC y el z-score del IMC y las variables bioquímicas en la edad prepuberal.

	LEPTINA	ADIPONECTINA	INSULINA	GRELINA
IMC	0,632***	-0,263**	0,299***	-0,185
IMCz-score	0,640***	-0,208*	0,299***	-0,111

* $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.2. ADOLESCENCIA

En las niñas de 13 a 16 años existe una correlación significativa de los niveles de leptina e insulina con el IMC y el z-score del IMC y los perímetros de la cintura y la cadera, siendo los coeficientes de correlación mayores para la leptina. Lo mismo ocurre con la masa grasa, dato del que disponemos en un subgrupo de estas niñas a la edad adolescente. No se

objetiva correlación entre los niveles de grelina y adiponectina y las variables antropométricas a esta edad (tabla 23).

Tabla 23. Correlación entre el IMC y el z-Score del IMC, la cintura y la masa grasa con las variables bioquímicas en la adolescencia.

	LEPTINA ^a	ADIPONECTINA ^b	INSULINA ^a	GRELINA ^a
IMC	0,640***	-0,131	0,286***	-0,046
IMC z-score	0,623***	-0,103	0,279***	-0,048
Cintura	0,557***	-0,120	0,281***	0,037
Cadera	0,594***	-0,07	0,208**	-0,008
Masa grasa (Kg)	0,667***	-0,017	0,385***	-0,107
% de masa grasa	0,689***	0,033	0,368**	-0,047

* $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Correlación: ^a Spearman, ^b Pearson

Como era de esperar, la masa grasa correlaciona de forma significativa con los otros datos antropométricos, obteniendo una correlación significativa elevada entre la grasa corporal y el peso, el IMC y los perímetros de cintura y cadera (tabla 24).

Tabla 24. Correlación de Pearson entre la masa grasa y el peso, la talla, el IMC, el z-score del IMC, la cintura, el z-score de la cintura y la cadera a la edad de 13-16 años.

	Masa grasa (Kg)	% de masa grasa
Peso	0,944***	0,300***
Talla	0,380***	0,274*
IMC	0,902***	0,830***
IMC z-score	0,896***	0,825***
Cintura	0,846***	0,802***
Cintura z-score	0,838***	0,798***
Cadera	0,903***	0,843***

* $p < 0,5$, *** $p < 0,001$

5. VARIABLES BIOQUÍMICAS Y EDAD DE LA MENARQUIA

5.1. NIVELES DE LEPTINA, ADIPONECTINA, INSULINA Y GRELINA A LOS 6-8 AÑOS Y EDAD DE LA MENARQUIA

Al analizar las correlaciones de la edad de la menarquia y los niveles de las variables bioquímicas consideradas en este estudio (leptina, adiponectina, insulina y grelina) a los 6-8 años, observamos que existe una correlación negativa significativa entre los niveles de leptina e insulina en la época prepuberal y la edad de la menarquia. Dada la correlación significativa existente entre el IMC en la edad prepuberal y la leptina, la adiponectina y la insulina (tabla 22), el análisis de correlación ha sido ajustado por el IMC a esta edad (tabla 25). Tras este ajuste, la correlación se mantiene significativa en el caso de la leptina.

Tabla 25. Correlación de Spearman de la edad de la menarquia con los niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina en niñas prepuberales y correlación parcial de los mismos tras ajustar por el IMC a esta edad.

	Edad de la menarquia	Edad de la menarquia ajustada por IMC
Leptina (ng/ml)	-0,253**	-0,252*
Adiponectina (µg/ml)	0,133	-0,07
Insulina(µUI/ml)	-0,270**	-0,161
Grelina (pg/ml)	-0,017	-0,033

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Dada la importante correlación existente entre el IMC y la leptina, decidimos evaluar, asimismo, la correlación de la edad de la menarquia con los datos antropométricos en la

edad prepuberal, ajustando el análisis por los niveles de leptina a esa edad, observando que, en este caso, las correlaciones dejan de ser significativas (tabla 26).

Tabla 26. Correlación de Spearman de edad de la menarquia con los datos antropométricos a los 6-8 años y correlación parcial de los mismos tras ajustar por los niveles de leptina.

	Edad de la menarquia	Edad de la menarquia ajustada por leptina
Peso (kg)	-0,227**	-0,121
Talla (cm)	-0,132	-0,73
IMC (kg/m²)	-0,240**	-0,098
IMC z-score	-0,253**	-0,106

** $p < 0,01$

Asimismo, se han analizado los niveles de estos péptidos en función de los grupos definidos de edad de la menarquia, tanto en las niñas prepuberales en conjunto (tabla 27), como por separado en las niñas con normopeso (tabla 28) y con exceso de peso (tabla 29) a esta edad.

Al realizar este análisis se objetiva que los niveles de leptina a la edad de 6-8 años son significativamente mayores en las niñas que tiene una edad de la menarquia más temprana (tabla 27), diferencias que se observan tanto en las niñas con normopeso (tabla 28), como en las niñas con exceso de peso (SP+OB) para su edad (tabla 29). En el caso de la insulina, se observa que las niñas con edad de la menarquia más temprana tienen niveles plasmáticos de insulina mayores en la edad prepuberal, diferencia que sólo se mantiene significativa en las niñas que tienen sobrepeso u obesidad a esta edad. Respecto a los niveles de adiponectina y de grelina, no se observan diferencias significativas atendiendo a las categorías establecidas de edad de la menarquia.

Tabla 27. Niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina (media e intervalo de confianza al 95%) en niñas a los 6-8 años en función del grupo de edad de la menarquia.

	Grupo 1 EM < 12 años n=48	Grupo 2 12 ÷ EM <13 años n=65	Grupo 3 EM × 13 años n=55	p	
				ANOVA	Post Hoc
Leptina (ng/ml)	7,01 (5,49-8,54)	6,60 (5,26-7,94)	3,88 (3,23-4,53)	0,001	1-3** 2-3**
Adiponectina (µg/ml)	14,62 (12,85-16,38)	16,18 (14,25-18,11)	16,38 (14,57-18,19)	NS	-
Insulina (µUI/ml)	4,50 (3,62-5,38)	3,64 (2,89-4,40)	2,82 (2,47-3,17)	0,005	1-3**
Grelina (pg/ml)	n=35	n=42	n=45	NS	-
	457,3 (344,4-570,2)	479,0 (366,5-591,6)	493,5 (359,0-627,9)		

ANOVA: análisis de la varianza. Post hoc: Games-Howell, ** $p < 0,01$.

Tabla 28. Niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina (media e intervalo de confianza al 95%) en niñas prepuberales (6-8 años) con normopeso en función del grupo de edad de la menarquia (EM).

NORMOPESO (6-8 AÑOS)	Grupo 1 EM < 12 años n=31	Grupo 2 12 ÷ EM <13 años n=42	Grupo 3 EM × 13 años n=42	p	
				ANOVA	Post Hoc
Leptina (ng/ml)	5,08 (3,64-6,52)	3,59 (2,79-4,39)	3,29 (2,55-4,03)	0,028	1-3*
Adiponectina (µg/ml)	14,81 (12,49-17,12)	18,31 (15,45-21,18)	16,56 (14,27-18,86)	NS	-
Insulina (µUI/ml)	3,90 (2,54-5,26)	2,79 (2,29-3,29)	2,83 (2,37-3,30)	NS	-
Grelina (pg/ml)	n=23	n=28	n=33	NS	-
	497,4 (342,7-652,1)	488,2 (332,2-644,1)	529,4 (383,0-675,7)		

ANOVA: análisis de la varianza. Post hoc: Tukey, * $p < 0,05$.

Tabla 29. Niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas prepuberales (6-8 años) con sobrepeso y obesidad (SP+OB) en función de la categoría de edad de la menarquia (EM)

SP+OB (6-8 AÑOS)	Grupo 1 EM < 12 años n=17	Grupo 2 12 ≤ EM < 13 años n=23	Grupo 3 EM ≥ 13 años n=13	p	
				ANOVA	Post Hoc
Leptina (ng/ml)	10,79 (8,05-13,53)	10,01 (7,32-12,70)	5,33 (4,10-6,56)	0,011	1-3* 2-3*
Adiponectina (µg/ml)	14,97 (11,53-18,40)	13,65 (10,70-16,61)	16,14 (11,61-20,67)	NS	-
Insulina (µUI/ml)	5,76 (4,37-7,16)	5,48 (2,90-8,06)	2,62 (1,86-3,38)	0,033	1-3**
Grelina (pg/ml)	n=12	n=14	n=12	NS	-
	475,1 (213,5-736,6)	562,9 (292,4-833,4)	271,5 (93,9-449,0)		

ANOVA: análisis de la varianza. Post Hoc: Games-Howell o Tukey, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5.2. VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE LAS VARIABLES BIOQUÍMICAS ENTRE PRIMER Y SEGUNDO CORTE Y EDAD DE LA MENARQUIA

Se ha analizado cómo evolucionan los niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina a lo largo de la infancia, y si las variaciones de estos niveles entre la edad prepuberal y la adolescencia se relacionan con la edad de la menarquia. Como se observa en la [tabla 30](#), existe una correlación negativa significativa de las variaciones de niveles de insulina y adiponectina entre ambas edades y la edad de la menarquia. Dada la correlación existente entre las variaciones del z-score del IMC y las variaciones de leptina ($r=0,457$, $p 0,000$), las variaciones de grelina ($r=-0,363$, $p 0,000$) y las variaciones de insulina ($r=0,239$, $p 0,009$) se ha realizado el análisis de correlación ajustando por la variación del z-score del IMC y por la edad de las niñas en el segundo corte. Tras realizar estos ajustes, esta correlación sólo permanece significativa para la variación de adiponectina.

Tabla 30. Correlación de la edad de la menarquia con las variaciones de los niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina entre ambas edades.

	Edad de la menarquia	Edad de la menarquia controlada por edad y por la del IMC z-score
Leptina (ng/ml)	-0,132	-0,158
Adiponectina (µg/ml)	-0,174*	-0,207 *
Insulina (µUI/ml)	0,163*	0,153
Grelina (pg/ml)	0,027	0,019

: diferencia entre los valores a los 13-16 años y en la época prepuberal.

$p: * < 0,05$

5.3. ANÁLISIS DE REGRESIÓN

Se ha procedido al diseño de un modelo de regresión múltiple considerando como variable dependiente la edad de la menarquia. Como variables independientes se han incluido aquellas variables que en el análisis univariante han mostrado relación estadísticamente significativa con la edad de la menarquia: niveles de leptina e insulina en el primer corte y variaciones de niveles de adiponectina entre ambas edades. Todo ello, controlado por el z-score del IMC del primer corte. El z-score del IMC no se ha incluido en el modelo de regresión para evitar la aparición de colinealidad puesto que tiene una correlación importante con los niveles de leptina ($r=0,623$, $p<0,001$) e insulina ($r=0,279$, $p<0,001$). Finalmente, este análisis mostró que únicamente los niveles de leptina en la edad prepuberal contribuían significativamente en la edad de la menarquia. Así, el coeficiente de determinación (R^2) era de 0,153 ($p=0,005$); es decir, en nuestra muestra, el 15% de la variación de la edad de la menarquia se explica por los niveles de leptina en la etapa prepuberal. El coeficiente del análisis es de 0,08, lo que implica que a la edad prepuberal, por cada ng/ml más de leptina se espera una edad de la menarquia 29 días más precoz.

6. EDAD DE LA MENARQUIA Y NIVELES DE LEPTINA EN RELACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS

Se han descrito unos valores de IMC y niveles de leptina a la edad prepuberal significativamente mayores en niñas que posteriormente tenían la menarquia más temprana respecto a las niñas que la tenían más tardía. Estas dos variables, IMC y leptina, tienen una correlación muy importante. De ambos parámetros, parece ser la leptina la que ejerce una mayor influencia sobre la edad de la menarquia. Así, hemos realizado diferentes análisis para profundizar en el estudio de la relación de estos parámetros con la edad de la menarquia, con el objetivo de poder identificar, a la edad prepuberal, a las niñas que tienen riesgo de tener un desarrollo puberal más temprano.

6.1. TERCILES DE LEPTINA POR CATEGORÍAS DE PESO Y RELACIÓN CON LA EDAD DE LA MENARQUIA

La media de los niveles de leptina a la edad prepuberal en las niñas con normopeso es de 3,89 ng/ml (IC al 95% de 3,33-4,45 ng/ml), y en las niñas prepuberales con sobrepeso u obesidad es de 9,11ng/ml (IC al 95% de 7,58-10,63 ng/ml), diferencia que es significativa ($p < 0,001$).

Dado el importante papel adjudicado a la leptina en relación con la edad de la menarquia y la diferencia de sus niveles en las categorías de peso en la edad prepuberal, hemos querido analizar su relación con la edad de la menarquia por categorías de peso. Para este análisis, se han calculado terciles de los niveles de leptina en la época prepuberal para cada categoría de peso. Así, hemos observado edades de la menarquia menores en el tercil más alto de leptina, tanto en niñas con normopeso ([tabla 31](#)), como en niñas con exceso de peso (sobrepeso y obesidad) ([tabla 32](#)), diferencia que es significativa sólo en las niñas con

exceso de peso. El rango del tercil más alto de leptina comienza en 4,5 ng/ml para las niñas con normopeso y en 10,3 ng/ml para las niñas de la misma edad con sobrepeso u obesidad.

Tabla 31. Edad de la menarquia y niveles de leptina en niñas prepuberales con normopeso en función de terciles de leptina.

NIÑAS CON NORMOPESO	Primer tercil de leptina (0,24-2,44)	Segundo tercil de leptina (2,44-4,55)	Tercer tercil de leptina (4,56-18,15)
	n=39	n=38	n=38
Leptina (ng/ml)	1,48 (1,52-1,72)	3,30 (3,06-3,54)	6,83 (5,82-7,83)
Edad de la menarquia (años)	12,47 (12,12-12,81)	12,16 (11,74-12,58)	11,89 (11,48-12,31)

Tabla 32. Edad de la menarquia y niveles de leptina en niñas prepuberales con exceso de peso (sobrepeso y obesidad) en función de terciles de leptina.

NIÑAS CON EXCESO DE PESO (SP+OB)	Primer tercil de leptina (1,77-5,63)	Segundo tercil de leptina (5,68-9,54)	Tercer tercil de leptina (10,30-21,18)
	n=17	n=18	n=18
Leptina (ng/ml)	4,23 (3,45-5,01)	7,66 (6,95-8,37)	15,10 (13,37-16,84)
Edad de la menarquia (años)	12,26 (11,72-12,79)	12,26 (11,82-12,71)	11,05 (10,44-11,66)

6.2. RATIO LEPTINA/IMC EN NIÑAS PREPUBERALES Y RELACIÓN CON LA EDAD DE LA MENARQUIA

Dada la importante correlación entre los niveles de leptina y el IMC en las niñas a la edad prepuberal y la diferencia de los niveles de leptina entre las categorías de peso, adicionalmente se ha estudiado la relación del ratio leptina/IMC a la edad prepuberal con la

edad de la menarquia. La correlación entre el ratio leptina/IMC y la edad de la menarquia es significativa ($r=-0,284$, $p=0,001$). Asimismo, se observan ratios de leptina/IMC a la edad prepuberal significativamente menores en las niñas con la edad de la menarquia más tardía respecto a los otros grupos de edad de la menarquia. Así, las niñas con edades de la menarquia más tardía tienen menores niveles de leptina para su grado de adiposidad que las que tienen la menarquia más temprana (tabla 33).

Tabla 33. Valores del ratio leptina/IMC [media (intervalo de confianza al 95%)] en niñas prepuberales (6-8 años) en función de la categoría de edad de la menarquia (EM)

	GRUPO 1 EM < 12 años n=48	GRUPO 2 12 ≤ EM < 13 años n=65	GRUPO 3 EM ≥ 13 años n=55	p	
				ANOVA	PostHoc
Leptina/IMC	0,39 (0,31-0,46)	0,32 (0,26-0,37)	0,23 (0,19-0,27)	0,002	1-3** 2-3*

ANOVA: análisis de la varianza. Post Hoc: Games Howell, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

6.3. VARIACIÓN DE CATEGORÍA DE PESO ENTRE PRIMER Y SEGUNDO CORTE (NP/SP+OB) Y NIVELES DE LEPTINA

Finalmente, dada la influencia que ejercen sobre la edad de la menarquia la leptina a la edad prepuberal y los datos antropométricos desde la época prepuberal, sobre todo, los ascensos de peso entre esta edad y la adolescencia, se han estudiado los niveles de leptina a los 6-8 años, así como de la variación de sus niveles entre la edad prepuberal y la adolescencia, con los cambios de categoría de peso (tabla 34). Así, vemos que de entre las niñas prepuberales con normopeso (grupos 1 y 2), las que presentan mayores niveles de leptina a los 6-8 años son aquellas que aumentan de peso entre ambas edades (grupo 2, NP→SP+OB) y que son las que tienen la edad de la menarquia más precoz. De entre las niñas con sobrepeso en la edad prepuberal (grupos 3 y 4) observamos que las que se mantienen con sobrepeso en la

adolescencia (grupo 4, SP+OB→SP+OB), poseen mayores niveles de leptina a los 6-8 años y tienen menor edad de la menarquia. En estos grupos de variación de categoría de peso, las variaciones del IMC y de los niveles de leptina entre la edad prepuberal y la adolescencia van en asociación inversa con la edad de la menarquia.

Tabla 34. Edad de la menarquia, IMC y leptina en época prepuberal, variación del IMC y de leptina (media [intervalo de confianza al 95%]) en función de los cambios de categoría de peso entre los 6-8 años y los 13-16 años.

	Grupo 1 NP→NP n=107	Grupo2 NP→SP+OB n=11	Grupo 3 SP+OB→NP n=27	Grupo 4 SP+OB→SP+OB n=23	p	
					ANOVA	Post Hoc
Edad de la menarquia	12,28 (12,06-12,52)	10,98 (10,26-11,69)	12,20 (11,83-12,57)	11,39 (10,83-11,95)	0,000	1-2** 1-4** 2-3*
Leptina (ng/ml) 6-8 años	3,65 (3,14-4,16)	6,4 (2,76-10,05)	7,1 (5,58-8,63)	11,75 (9,27-14,23)	0,000	1-3*** 1-4*** 2-4** 3-4***
IMC (kg/m²) 6-8 años	15,73 (15,47-16,99)	16,56 (16,06-17,06)	19,32 (18,76-19,87)	20,10 (19,27-20,94)	0,000	1-2* 1-3*** 1-4*** 2-3*** 2-4***
leptina (ng/ml)	10,91 (9,02-12,80)	24,25 (18,52-29,97)	8,54 (4,98-12,10)	20,70 (15,18-26,22)	0,000	1-2*** 1-4*** 2-3*** 3-4***
IMC z-score	0,18 (0,07-0,28)	1,25 (0,81-1,69)	-0,92 (-1,2 - -0,64)	0,22 (-0,16-0,60)	0,000	1-2** 1-3*** 2-3*** 2-4** 3-4***

NP: normopeso; SP+OB: incluye niñas con sobrepeso y con obesidad. ANOVA: análisis de la varianza. Post hoc: Tukey o Games-Howell, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Discusión

El primer ciclo menstrual es un punto clave en el desarrollo puberal de las niñas, hecho que acontece a una edad distinta para cada mujer. Frente a otros cambios que se producen de forma más temprana en el desarrollo puberal femenino, como la telarquia, la edad de la menarquia es muy utilizada en estudios que evalúan el momento del desarrollo puberal de las niñas, dada la facilidad de obtener información sobre ella.

Aunque estudiar sólo la edad de la menarquia podría llevar a conclusiones erróneas, puesto que el tiempo entre la aparición de los primeros caracteres sexuales secundarios y la del primer ciclo menstrual es variable, la menarquia es un hecho fundamental en la vida de una mujer y es considerada socialmente como el cambio de la niñez a la adolescencia. El momento en el que se produce el primer ciclo menstrual tiene implicaciones físicas, psicológicas y sociales, por lo que es importante estudiar los factores que la condicionan, aunque forme parte de una secuencia de cambios previos, sin los cuales no podría llevarse a cabo y que deberían, asimismo, ser investigados.

El estudio del desarrollo puberal de las niñas participantes no era un objetivo principal del el Estudio Cuatro Provincias, y por ello, reconocemos que éste carece de datos significativos para analizarlo, como es el estadio de desarrollo puberal según la clasificación de *Tanner* de las niñas del segundo corte en la adolescencia o la edad de la menarquia de las madres. Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, dado que el estudio disponía del dato de la edad de la menarquia, recogido de una forma que consideramos fiable, decidimos realizar este análisis en el contexto de dicho Estudio Cuatro Provincias.

La edad de la menarquia observada en las niñas de nuestro estudio es de 12 años. Si comparamos este dato con los datos procedentes de estudios epidemiológicos en población española realizados en los últimos seis años (tabla 35), observamos que la edad de la menarquia de nuestra población no difiere de la edad media de la menarquia en otras

poblaciones de niñas españolas^{14,222}. Al analizar los resultados de estudios realizados en población española, hace más de quince años, encontramos resultados dispares. Así, el estudio de *Rebato y colaboradores*¹¹, publicado en el año 1993, muestra una edad media de la menarquia de 12,75 años, frente al estudio de *de la Puente*⁹, en el que se describe una edad media de la menarquia de 12,31 años. La comparación de nuestros datos con otros estudios es difícil, ya que son pocos los estudios realizados en niñas españolas y, los existentes, se caracterizan por centrarse en determinadas áreas regionales y ser, en su mayoría, transversales (tabla 35).

Tabla 35. Estudios en población española que estudian la edad de la menarquia.

AUTOR	AÑO	POBLACIÓN	EDAD DE LA MENARQUIA (años)
Soriano ¹⁴	2008	227 niñas Madrid	12,17 (IC del 95%, 12,06-12,28) Madres 12,68 (IC del 95% 12,48-12,88)
Marco Hernández ²²²	2008	266 niñas Madrid	12,42 (1,01 DE) Madres 12,47 (1,34 DE)
Carrascosa ¹⁰	2004	328 niñas Cataluña	12,78 (1,3 DE)
Marrodan ¹³	2000	811 niñas Madrid	Zona rural: 12,9 (1,03 DE) Zona urbana: 12,79 (1,04 DE)
de la Puente ⁹	1997	Cataluña	12,31
Sánchez Andrés ¹²	1997	267 niñas Madrid	13,03 (1,51 DE) Madres 13,45 años (1,28 DE)
Rebato ¹¹	1993	894 niñas País Vasco	12,75 (0,04 DE)

Como queda reflejado en la tabla 35, los estudios realizados en población española son relativamente modernos como para analizar la tendencia secular de la edad de la menarquia descrita para otras poblaciones, en las que se observa un descenso significativo de la edad de la menarquia (de 16-17 años a 12-13 años), principalmente a lo largo de los siglos XIX y XX¹⁶⁻¹⁹, tendencia que en los últimos años no parece seguir progresando²². En población

española, *Sánchez Andrés* analizó la edad de la menarquia de niñas nacidas a partir de la década de los cuarenta, siendo de 13,03 años y ligeramente menor que la de sus madres, las más antiguas nacidas en el año 1922, que fue de 13,45 años¹².

Considerando que los determinantes genéticos son un factor importante en relación con el tiempo de desarrollo puberal, resultan interesantes este tipo de estudios poblacionales en los que participen distintas generaciones de una misma familia (abuelas, madres e hijas). En estos estudios familiares se demuestra la influencia del ambiente a lo largo del tiempo, probablemente a través de mecanismos epigenéticos. Como comentábamos, en población española hay pocos estudios que analicen la edad de la menarquia en niñas y en sus madres, y los datos que muestran son distintos (tabla 35): hay dos estudios que muestran una más tardía edad de la menarquia en las madres de las niñas de una población madrileña^{12,14} y otro trabajo, realizado en la misma población y coincidente en el tiempo, no muestra una tendencia entre las edades de la menarquia de madres e hijas²². Lamentablemente, en nuestro estudio no disponemos de la edad de la menarquia de las madres de las niñas participantes.

Nuestro estudio incluye niñas de cuatro provincias del país, geográficamente distintas y con diferentes condiciones ambientales. Aunque no hemos encontrado diferencias en la edad de la menarquia entre niñas de las distintas provincias, sí se observa una menor edad de la menarquia en las niñas de Cádiz, provincia donde es significativamente más frecuente encontrar niñas con edad de la menarquia más temprana que en Madrid. Este hallazgo, sin embargo, no se justifica por diferencias en datos antropométricos ni por los niveles de leptina circulantes en la edad prepuberal (resultados no mostrados), que hemos observado en nuestro estudio como claros determinantes de edad de la menarquia, por lo que tienen que existir otros factores que hagan que en esta provincia la menarquia sea más temprana.

Para estudiar la influencia del ambiente sobre la edad a la que acontece el primer ciclo menstrual se realizó un estudio en población madrileña, que comparaba la edad media de la menarquia de 342 niñas que vivían en zona rural y de 469 niñas que vivían en zona urbana de la provincia de Madrid, sin observar diferencias significativas en la edad de la menarquia¹³.

DATOS ANTROPOMETRICOS Y EDAD DE LA MENARQUIA

La relación del índice de masa corporal y otros datos antropométricos con la edad de la menarquia está admitida y son varios los estudios que la demuestran, sobre todo en niñas adolescentes. La conclusión parece clara: existe una asociación negativa entre el IMC o el grado de adiposidad y la edad de la menarquia. De esta forma, esta influencia del peso sobre la edad de la menarquia parece que tiene efecto desde épocas tempranas de la vida²².

En nuestro conocimiento, no hay estudios longitudinales en población española que hayan analizado la relación del IMC en la edad infantil con la edad de la menarquia o que estudien la variación del IMC entre la edad prepuberal y la adolescencia y lo comparen con la edad de la menarquia, como en este trabajo. En este sentido, con los resultados obtenidos, en nuestro estudio se observa una importante influencia de la variación del IMC entre los 6 y 8 años y los 13 y 16 años en las niñas sobre la edad de la menarquia.

Hemos descrito una correlación negativa entre la edad de la menarquia y variables antropométricas en las edades analizadas, siendo la menarquia más temprana en niñas con sobrepeso y obesidad comparado con las niñas con peso normal. En esta línea, varios estudios han demostrado que las niñas puberales tienen mayor IMC ajustado por edad que las niñas de la misma edad todavía prepuberales^{25,88} y que niñas con mayores IMC tienen

con mayor frecuencia un desarrollo puberal más precoz que sus coetáneas con IMC más bajos^{87,89}. Sin embargo, otros estudios fallan en encontrar esta asociación. En el estudio español de *Ferrández y colaboradores* no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IMC para la edad y sexo en los cinco grupos que ellos describen de tiempo de maduración puberal (analizando el pico de velocidad de crecimiento como marcador puberal) durante los periodos prepuberal y puberal, aunque sí describen una tendencia entre estos valores, siendo los valores medios de IMC ligeramente mayores en el grupo de los niños que maduraban más precozmente²⁷.

En población danesa, *Mouritsen y colegas* no observaron diferencias de valores absolutos de IMC entre niñas con telarquia más precoz (reconocida por palpación y divididas por cuartiles en función de la edad de aparición de telarquia) en comparación con las niñas que presentaban telarquias más tardías⁹². Estas discrepancias podrían ser debidas a que están usando valores absolutos de IMC en lugar de estandarizarlo (cálculo de SDS o z-score) para la edad con las tablas correspondientes a la población, como se ha realizado en nuestro estudio.

La relación del IMC con la edad de la menarquia podría considerarse mediada por la cantidad de masa grasa presente en el organismo. En este estudio hemos confirmado esta relación al encontrar una asociación entre menarquias más temprana y mayores perímetros de cintura y cantidad de masa grasa en nuestras niñas adolescentes del segundo corte, de entre 13 y 16 años. Asimismo, *Davison et al* mostraron que las niñas con mayor cantidad de masa grasa y mayor perímetro de la cintura a los 7 y 9 años de edad tenían más posibilidades de tener un desarrollo puberal más temprano a la edad de 9 años, reconociendo la aparición de datos puberales mediante la inspección de la aparición de telarquia⁹³. Un estudio retrospectivo de niñas de Seúl de séptimo grado mostró que niñas

con edades de la menarquia menores de 12 años tenían mayor cantidad de masa grasa, pero no mayor perímetro de la cintura, que las niñas con menarquia más tardía⁹⁵. Es preciso destacar que son pocos los estudios que relacionan la edad de la menarquia o el tiempo de maduración puberal con la cantidad de masa grasa en el organismo, probablemente por la mayor dificultad para obtener este dato en comparación con otras medidas antropométricas más accesibles como el IMC o los perímetros de la cintura y cadera, utilizados comúnmente como marcadores de depósito de grasa. Un estudio clásico²²³ muestra una correlación significativamente positiva entre IMC y la cantidad de masa grasa medida por DEXA (método de absorciometría) ajustándolo por edad, raza, sexo y estado madurativo. Por otra parte, la correlación entre el grado de adiposidad y el IMC es elevada, sobre todo en individuos con sobrepeso y obesidad⁸⁶. Así, atendiendo a esta importante correlación que tiene el IMC con el porcentaje de grasa corporal, el IMC parece un parámetro fiable para considerarlo como marcador de adiposidad. En los datos recogidos de las niñas participantes en el segundo corte de nuestro estudio, se observa una correlación significativa elevada del IMC y del z-score del IMC con la cantidad de masa grasa y con su porcentaje en el organismo. Por lo tanto, nosotros también consideramos que el IMC es un valor fácilmente mensurable que puede representar de forma adecuada a la cantidad de masa grasa en una población de niños sanos, más si se implementa con otros datos antropométricos como las circunferencias de la cintura y la cadera.

Respecto a los datos antropométricos al nacimiento, en este estudio no hemos observado ninguna correlación del peso al nacimiento, del z-score del peso al nacimiento ni del índice ponderal con la edad de la menarquia. Algunos estudios han descrito la relación de parámetros antropométricos al nacimiento con adrenarquias prematuras y desarrollos puberales más adelantados^{100,101,224}, pero otros estudios no encuentran asociación alguna^{95,102}. Respecto a la edad de la menarquia, son pocos los trabajos que estudian su

asociación con parámetros antropométricos al nacimiento. En el estudio de *Tam y colaboradores*, realizado en población australiana, no observaron correlaciones significativas entre los datos antropométricos al nacimiento y la edad de la menarquia de forma global, pero realizando grupos en función del peso al nacimiento se observa que las niñas que nacen con menor peso para su longitud tienen menarquias más precoces que las que nacen con pesos más elevados para su longitud²²⁵. En población española, se realizó un estudio en niñas con pubertad adelantada (aparición de telarquia entre los 8 y los 9 años de edad) donde las niñas con menor peso al nacimiento (peso de recién nacidas menor de -1,5 SDS para la edad gestacional) tenían la menarquia más precoz que las niñas con peso normal al nacimiento para la edad gestacional (11,3 *versus* 12,9 años)¹⁰⁰. En este estudio, llama la atención la duración del desarrollo puberal en ambos grupos (3 *versus* 4,5 años), pudiendo condicionar el peso al nacimiento la velocidad del desarrollo puberal. En el estudio antes comentado de *Ferrández y colaboradores*, no se encontró diferencias del peso al nacimiento entre los distintos grupos de maduración puberal²⁷. En definitiva, pensamos que son necesarios más estudios longitudinales, multicéntricos y con mayor tamaño muestral en nuestra población para poder aclarar la posible relación entre los datos antropométricos al nacimiento y el tiempo de maduración puberal.

La mayoría de los estudios que analizan datos antropométricos y los comparan con la edad de la menarquia son transversales. Por ello, un aspecto relevante de este trabajo es la naturaleza longitudinal del mismo, lo que ha permitido contrastar la influencia de la evolución del IMC entre los dos cortes del estudio, la infancia y la adolescencia, sobre la edad de la menarquia. En este sentido, hemos observado que el mayor determinante antropométrico sobre la edad de la menarquia es la variación de la categoría de peso entre estas edades, habiendo observado la media de edad de la menarquia más temprana en las niñas que teniendo un IMC normal para la edad a los 6-8 años pasan a tener IMC elevado a

los 13-16 años, es decir aquellas niñas con mayores incrementos de peso para la talla entre ambas edades. Por desgracia, en las niñas del primer corte, no tenemos datos de la cantidad de grasa ni de otros índices antropométricos indicadores indirectos de la cantidad de grasa del individuo (cintura, pliegues cutáneos), por lo que no podemos comparar la influencia de la cantidad de grasa prepuberal o los cambios en la composición corporal a lo largo de la infancia sobre la edad de la menarquia, lo cual hubiera sido muy interesante. En este sentido, estudios como el de *Davison y colaboradores* muestran que niñas con mayor porcentaje de masa grasa a la edad de 5 años y su incremento hasta la edad de 9 años tenían, a esta edad, más posibilidad de tener datos de desarrollo puberal, entendiendo este como la presencia de telarquia determinada por inspección y/o niveles elevados de estradiol y/o puntuación elevada en una escala validada de desarrollo puberal contestada por sus madres⁹³. *Lee y colegas* mostraron que mayores z-score del IMC a edades tan tempranas como 36 meses y mayores cambios en el IMC entre la edad de 36 meses y primer grado (periodos claramente prepuberales) se asociaban con pubertades más tempranas⁹⁴. En una cohorte de Seúl se describió que el IMC a los 8 y 9 años y el aumento de IMC entre los 7 y los 9 años de edad estaban asociados con menarquia más tempranas⁹⁵. Resultados parecidos han sido observados en algunas poblaciones europeas: en niñas suecas se describió una correlación negativa entre cambios del IMC entre los 2 y los 8 años y la edad a la que se produce el pico de velocidad de crecimiento como marcador de pubertad⁹⁶ o en niñas escolares portuguesas donde las niñas obesas desde los siete años tienen menarquias más tempranas que las niñas de la misma edad con normopeso⁹⁷.

Para analizar la variación de los datos antropométricos desde el nacimiento decidimos usar el índice ponderal, al considerarlo el más fiable en nuestra base de datos. No observamos ninguna relación con el índice ponderal y la edad de la menarquia. Atendiendo a la bibliografía publicada, que relaciona pesos menores al nacimiento con adelantos puberales,

tanto en forma de gonadarquia como, más frecuentemente, en forma de adrenarquia^{100,101,225}, clasificamos a las niñas en dos grupos en función del índice ponderal, separando a aquellas niñas con menor índice ponderal (indicador de crecimientos intrauterinos asimétricos) de las que tienen un índice ponderal más elevado. Así, tampoco encontramos ninguna influencia sobre la edad de la menarquia de los cambios de categoría de peso entre el nacimiento y las edades prepuberal y adolescente, ya que en la relación significativa hallada de la edad de la menarquia con los cambios de categoría entre el índice ponderal al nacimiento y el IMC en la adolescencia pensamos que pesa mucho la influencia que sobre la edad de la menarquia ejercen los cambios del IMC que se producen entre la infancia y la adolescencia. En el estudio de *Sloboda y colaboradores*¹⁰¹ en una cohorte de niñas australianas, se observaron menores edades de la menarquia en las niñas que teniendo menor peso al nacimiento respecto al peso esperado tenían a los 8 años IMC por encima de 16,3 kg/m². Serían necesarios más estudios para valorar la posible asociación de la variación de los datos antropométricos entre el nacimiento y otras etapas de la pediatría con el momento del desarrollo puberal, pero actualmente nosotros no podemos afirmar un papel influente de estas variaciones sobre la edad de la menarquia.

En definitiva, aunque son pocos los estudios que analizan datos antropométricos en edades tempranas de la vida y su influencia sobre la edad de la menarquia, no queda duda de que, desde edades precoces de la vida, el grado de adiposidad actúa sobre la consecución del desarrollo puberal posterior. Por ello, se especula con que señales periféricas relacionadas con el estado nutricional, ya sean de origen adiposo o del tracto digestivo, actuarían sobre alguno de los puntos del eje gonadotropo (principalmente en el hipotálamo o la hipófisis) que, aunque se encuentra quiescente en la edad infantil, está continuamente recibiendo información desde la periferia.

PEPTIDOS DERIVADOS DE TEJIDOS ADIPOSO Y GASTROINTESTINAL Y EDAD DE LA MENARQUIA

Como hemos comentado, en la relación existente entre el IMC y el momento del desarrollo puberal influye el grado de adiposidad. Por ello, moléculas directamente derivadas del tejido adiposo o relacionadas con la cantidad de grasa presente y con las necesidades de energía del organismo, se han relacionado con la edad de la menarquia⁸¹.

Existen estudios que describen los cambios en los niveles de péptidos relacionados con el estado metabólico del organismo a lo largo de la infancia y en los diferentes estadios puberales, intentando caracterizar sus niveles normales en las distintas edades^{106,110,182}. Sin embargo, muy pocos estudios analizan la posible influencia de los niveles de estos péptidos con la edad de la menarquia. Así, en lo que sabemos, este es el primer estudio en población española que analiza los niveles de péptidos relacionados con el metabolismo en la edad prepuberal y los relaciona con la edad de la menarquia.

Al analizar la asociación de la edad de la menarquia con los niveles a la edad prepuberal de leptina, adiponectina, insulina y grelina, hemos encontrado una importante relación entre mayores niveles de leptina a los 6-8 años y edades de la menarquia más tempranas.

Sabemos que los niveles de leptina aumentan a lo largo de la infancia, y lo hacen de forma paralela a los cambios que se producen en la composición corporal: aumento de la cantidad de masa grasa y aumento del índice de masa corporal¹⁰⁶. Como venimos comentando, al igual que lo observado en nuestra población, en otras poblaciones se ha demostrado una asociación negativa entre la edad de la menarquia y el IMC en las distintas etapas de la edad pediátrica²². La fuerte correlación existente entre el IMC y los niveles de leptina es evidente en las poblaciones estudiadas^{105,106}, incluida la nuestra. Así, es interesante estudiar la asociación de ambos parámetros con la edad de la menarquia teniendo en cuenta su fuerte

influencia. En este sentido, la correlación existente de los niveles de leptina en la edad prepuberal con la edad de la menarquia se mantiene cuando se realiza una correlación parcial ajustado por el IMC (tanto en valor absoluto como en z-score). Al contrario, la correlación encontrada entre la edad de la menarquia y el IMC en las niñas a los 6-8 años desaparece cuando ajustamos por los niveles de leptina a esa edad. Estos datos sugieren que los niveles de leptina contribuyen de manera importante a explicar la asociación del IMC con la edad de la menarquia.

Estudios previos que analizan los niveles de diferentes hormonas en la edad prepuberal y los relacionan con la edad de la menarquia, reportan resultados divergentes en cuanto a la relación entre la edad de la menarquia y los niveles de leptina^{225,226}. En su estudio, *Thankamony y colaboradores*, en un subgrupo de 329 niñas de una gran cohorte de niños ingleses nacidos en la década de los noventa, establecen tres categorías de edad de la menarquia, y entre estos grupos comparan variables tanto antropométricas como bioquímicas obtenidas en una valoración realizada cuando las niñas tenían entre 8 y 8,5 años. Así, observan diferencias significativas de las medias de datos antropométricos (peso, talla, IMC y perímetro de la cintura) pero no de la media de los niveles de leptina entre los diferentes grupos de la edad de la menarquia²²⁶. En un estudio de niñas australianas, nacidas a finales de los años ochenta, a las que se valoró a los 8 años y posteriormente a los 15 años, momento en el que se les preguntó por la edad de la menarquia, se observó una asociación negativa significativa de los niveles de leptina obtenidos a los 8 años con la edad de la menarquia ($r^2=0,05$), aunque no se observaron diferencias en los niveles de leptina (presentados como media y rango) a los 8 años en los tres grupos que se establecieron de edad de la menarquia, grupos entre los que se observan diferencias en las medias de IMC y perímetro de la cintura²²⁵. En este último trabajo, pensamos que no hay diferencias entre los niveles de leptina de los tres grupos analizados por edad de la menarquia porque existe una

importante dispersión de datos que hacen que los rangos respecto a la media sean muy amplios, sobre todo el límite superior. Quizás quitando los valores extremos y expresando los valores en intervalo de confianza al 95% se hubieran obtenido otros resultados. Esta discrepancia entre estos estudios comentados y con los resultados que obtenemos nosotros, podrían ser parcialmente explicadas por diferencias en la raza y las características de la población, incluyendo el grado de desarrollo puberal. Así, las niñas del primer corte de nuestro estudio son más jóvenes que las niñas participantes en estos estudios, lo cual es extremadamente importante cuando se quiere evaluar los niveles de leptina como señal de pubertades más tempranas.

Argumentando la importancia de los niveles de leptina en relación con la edad de la menarquia, hay un estudio¹⁴⁴ llevado a cabo en 343 niñas americanas en estadio II de *Tanner*, en las que se observó que unos niveles plasmáticos de leptina superiores a 12 ng/ml se asociaban al adelanto en la edad de la menarquia de un mes por cada incremento de 1ng/ml. Este estudio demuestra la influencia de la leptina sobre la edad de la menarquia, pero lo hace en niñas mayores y que ya han comenzado el desarrollo puberal, por lo que desde un punto de vista preventivo parece menos relevante.

Por otra parte, existen otras evidencias del papel protagonista de la leptina en el inicio y desarrollo de la pubertad en humanos. Por una parte, mutaciones en el gen del receptor de leptina se han asociado con un fenotipo de obesidad importante y con hipogonadismo hipogonadotropo¹¹⁴. Además, en estos pacientes el tratamiento con leptina recombinante mejora la secreción nocturna de gonadotropinas¹³⁷. También, la administración de leptina recombinante en mujeres con amenorrea hipotalámica aumenta los pulsos de LH y mejora la función ovárica de estas mujeres¹⁵¹. Al estudiar la relación de la leptina con datos de desarrollo puberal en situaciones de estrés metabólico, como es el caso de la anorexia

nerviosa, se ha demostrado que la mejora del estado nutricional produce de forma paralela un incremento de los niveles de leptina y de gonadotropinas^{81,106,146}. También, estudios genéticos, han observado asociación entre polimorfismos del gen de la leptina y del receptor de la leptina con la edad de la menarquia^{227,228}.

Nuestros datos sugieren que el efecto de los niveles de leptina sobre la edad de la menarquia puede ser diferente en niñas con normopeso y en el grupo de niñas con sobrepeso u obesidad. Así, los niveles de leptina son similares en las niñas con normopeso que tienen la menarquia más precoz (con menos de 12 años) y en las niñas con sobrepeso u obesidad que tienen la edad de la menarquia más tardía (con 13 o más años), niveles que se encuentran en el primer tercil de leptina en las niñas con sobrepeso u obesidad y en el tercer tercil de leptina en las niñas con normopeso. Este diferente comportamiento de la leptina podría ser debido, aparte de posibles factores genéticos, a un diferente comportamiento de la leptina en función del grado y el tiempo que llevan las niñas con el exceso de peso. Asumiendo un mismo papel de la leptina sobre la edad de la menarquia, quizá podríamos utilizar el término de *leptinosensibilidad* en niñas con normopeso o de *leptinorresistencia* en niñas con sobrepeso u obesidad. En este sentido, recientemente se ha publicado un estudio experimental¹³⁴ en el que se observa una diferente activación de los mecanismos de señalización celular en respuesta a la administración de leptina en ratas de diferente categoría de peso. Por otra parte, en ratones expuestos a sobrenutrición postnatal se observa una leptinorresistencia en el núcleo arcuato²²⁹. Así, distintos trabajos muestran un diferente comportamiento de la leptina entre diferentes categorías de peso. No obstante, partimos de estudios en animales de experimentación por lo que se plantea la necesidad de diseñar estudios longitudinales en niños prepuberales para poder corroborar estos hallazgos.

Dada la correlación de los niveles de leptina con el IMC y el distinto comportamiento de la leptina en los distintos grupos de categoría de peso, con objeto de profundizar en esta asociación, se realizó el cociente leptina/IMC con los datos obtenidos a la edad prepuberal. Así, vimos que las niñas con edad de la menarquia más precoz tenían mayores niveles de leptina para su IMC, diferencia significativa respecto a las niñas con menarquias más tardías, que tenían menos niveles de leptina para sus valores de IMC. La leptina y la cantidad de grasa correlacionan de forma importante. La alta correlación existente entre la edad de la menarquia y este coeficiente remarca de nuevo la importancia de la leptina sobre la edad de la menarquia, siendo el exceso de leptina circulante liberado por la misma cantidad de adiposidad lo que podría condicionar la edad de la menarquia. Así, más que de *leptinosensibilidad* o *leptinorresistencia*, podríamos hablar de *hipersecreción* de leptina para el grado de adiposidad. En este sentido, nosotros hemos cuantificado los niveles totales de leptina circulantes. Quizá, hubiese sido interesante medir y relacionar los niveles de leptina libre, forma activa, y de la unida a su receptor, con lo que se mostraría más claramente el papel activo de la leptina. Todas estas reflexiones requieren de nuevos estudios para corroborarlas y de investigaciones que analicen la evolución de los niveles elevados de leptina para el grado de adiposidad en niñas prepuberales.

Independientemente de lo comentado anteriormente, en todos los casos, nuestros resultados muestran una asociación inversa entre los niveles prepuberales de leptina y la edad de la menarquia, principalmente en niñas con sobrepeso y obesidad. Ello sugiere que, junto al estudio metabólico realizado a las niñas con exceso de peso (sobrepeso y obesidad) sería interesante medir los niveles de leptina. Con nuestros resultados, consideramos que niñas con sobrepeso u obesidad a la edad prepuberal que tengan niveles de leptina por encima de 10 ng/ml deberían ser vigiladas de forma estrecha.

Los datos del estudio apuntan igualmente a edades de la menarquia más tardías en niñas con menores IMC. La escasa prevalencia de desnutrición en nuestras niñas a la edad de 6-8 años (ninguna niña con desnutrición moderada ni grave y sólo un 5% de ellas con desnutrición leve) no nos han permitido realizar análisis estadísticos con ellas.

Los niveles de insulina prepuberales también se han asociado con la edad de la menarquia, pero esta asociación desaparece cuando se controla por el IMC. Además, en el análisis de regresión múltiple no aparece como parámetro predictor significativo. Así, en lugar de un factor independiente que contribuye en la edad de la menarquia, pensamos que el papel de la insulina va en paralelo con la fuerte influencia que sobre ella tiene el IMC y la leptina, variables con las que se la insulina se correlaciona de forma significativa.

Al analizar la influencia de las variaciones de los niveles de leptina, adiponectina, insulina y grelina entre las edades prepuberal y la adolescencia, sólo las variaciones de adiponectina se correlacionan de forma significativa con la edad de la menarquia tras ajustar por edad y variaciones del IMC. Sin embargo, este hallazgo no es consistente con otros resultados mostrados: ni la comparación de medias pareadas de adiponectina entre ambas edades es significativa, ni la variación de adiponectina entre ambas edades se muestra como un factor significativo al incluirlo como variable dependiente en el análisis de regresión múltiple. Desafortunadamente, no hemos encontrado datos en la literatura para comparar estos resultados, por lo que son necesarios más estudios en este sentido.

La grelina, como señal de deficiencia energética, ha sido asociada con un papel inhibitorio en el desarrollo puberal¹⁷³. Esto se ha demostrado por una progresiva reducción de sus niveles a lo largo de la pubertad¹⁸², lo que puede reflejar un papel permisivo en el inicio y desarrollo de la pubertad. En este estudio también se observa un descenso de los niveles de grelina entre los 6-8 años y los 13-16 años, pero no encontramos relación de estos niveles

ni de las variaciones de los mismos con la edad de la menarquia. No obstante, en los resultados puede influir la forma de cuantificar la grelina. Así, en este estudio hemos medido los niveles totales de grelina, que incluyen la forma acilada (más activa) y la forma no acilada. Dado que la proporción de estas dos formas de grelina no es estable, y en la pubertad hay un viraje a favor de la forma activa, quizás hubiera sido interesante medir sólo esta forma. A pesar de lo anteriormente comentado, nuestros datos no apoyan el uso de grelina como potencial marcador de desarrollo puberal.

En resumen, el exceso de peso durante la infancia es un factor de riesgo de tener la menarquia de forma más temprana. Particularmente, parece que la edad de la menarquia es muy sensible a cambios en el IMC entre la edad escolar y la adolescencia, siendo menor la influencia de los datos al nacimiento. Asimismo, los mayores niveles de leptina a la edad prepuberal, sobre todo en niñas con exceso de peso, se relacionan con edades de la menarquia más tempranas. Así, desde el punto de vista socio-sanitario, estos hallazgos añaden evidencia a otros hechos, de forma que tienen que poner en alerta a la comunidad científica y justifican realizar una mayor intervención sobre la obesidad infantil desde edades precoces dentro de la pediatría, tanto en la aplicación de medidas de prevención como en la necesidad de programas estrictos de seguimiento de los niños afectos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La edad de la menarquia en nuestra muestra es similar a la referenciada por otros autores de nuestro país en los últimos años.
2. En nuestra cohorte, la edad de la menarquia no está influenciada por los datos antropométricos del periodo neonatal.
3. El exceso de peso durante la edad prepuberal condiciona una edad de la menarquia más temprana. Además, la edad a la que se produce esta primera menstruación es especialmente sensible a incrementos del IMC entre la edad escolar y la adolescencia.
4. De los péptidos analizados relacionados con el metabolismo energético, únicamente los niveles de leptina en la edad prepuberal pueden considerarse como potenciales predictores de la edad de la menarquia.
5. Sería de interés en la práctica clínica la determinación de niveles de leptina en niñas prepuberales con obesidad. Aquellas con niveles elevados (>10 ng/ml) se beneficiarían de una monitorización más estrecha, si cabe, del peso y del desarrollo puberal.
6. Los cambios de leptina, adiponectina, grelina e insulina observados desde el periodo prepuberal a la adolescencia no parecen de utilidad como marcadores de tiempo de desarrollo puberal.

Bibliografía

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev* 2003;668-693
2. Carel JC, Léger J. Precocious puberty. *N Engl J Med* 2008;358:2366-2377
3. Palmer MR, Dunkel R. Delayed puberty. *N Engl J Med* 2012;366:443-453
4. Muñoz MT y Pozo J. Pubertad normal y sus variantes. *Pediatr Integral* 2011;15:507-518
5. Rodríguez Hierro F. Pubertad normal. En: Argente Oliver J, Carrascosa Lezcano A, Gracia Bouthelie R, Rodríguez Hierro F, ed. *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia* (1º edición). Madrid: Edimsa; 1995. p. 679-88.
6. Basdemir D, Rogol AD. Maduración puberal. En: Argente Oliver J, Carrascosa Lezcano A, Gracia Bouthelie R, Rodríguez Hierro F, ed. *Tratado de Endocrinología Pediátrica y de la Adolescencia* (2º edición). Madrid: Doyma; 2000. p. 843-66.
7. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969;44:291-303
8. Veldhuis JD, Roemmich JN, Richmond EJ, *et al.* Endocrine control of body composition in infancy, childhood, and puberty. *Endocr Rev* 2005;26:1446
9. de la Puente ML, Canela J, Alvarez J, Salleras L, Vicens-Calvet E. Cross-sectional growth study of the child and adolescent population of Catalonia (Spain). *Ann Hum Biol* 1997;24:435-52
10. Carrascosa A, Yeste D, Copil A, Gusynié M. Secular growth changes. Weight, height and body mass index values in infant, children, adolescent and young adults from Barcelona population. *Medlin (Barc)* 2004;123:445-451
11. Rebato E, Rosique J, González Apraiz A. Age at menarche from a Biscayan coastal population (Basque Country). *Ann Hum Biol* 1993;20:191-193
12. Sanchez Andrés. Genetic and environmental factors affecting menarcheal age in Spanish women. *Anthropol Anz* 1997;55:69-78
13. Marrodán MD, Mesa MS, Aréchiga J, Pérez-Magdaleno A. Trend in menarcheal age in Spain: rural and urban comparison during a recent period. *Ann Hum Biol* 2000;27:313-319

14. Soriano Guillén L, Blanco Rodríguez M, Cortés Martín M, Martínez Martín C. Secular trend of menarcheal age in Spanish adolescents. *Med Clin (Barc)* 2008;131:355-356
15. Towne B, Czerwinski SA, Demerath EW, Blangero J, Roche AF, Siervogel RM. Heritability of age at menarche in girls from the Fels Longitudinal Study. *Am J Phys Anthropol* 2005;128:210-219
16. Wyshak G, Frish RE. Evidence for a secular trend in the age of menarche. *N Engl J Med* 1982;306:1033-1035
17. Mac Mahon B. Age at menarche, United States. National Center for Health Statistics, Vital and Health Statistics, Washington, DC 1973; series 11. Report 133NCHS. DHEW Publication 74-1615
18. Euling SY, Herman-Giddens ME, Lee PA *et al.* Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for secular trends: panel findings. *Pediatrics* 2008;121:S172-191
19. Cho GJ, Shin JH, Hur YT *et al.* Age at menarche in a Korean population: secular trends and influencing factors. *Eur J Pediatr* 2010;169:548-554
20. Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, *et al.* Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatrics Research in Office Setting Network. *Pediatrics* 1997;99:505
21. Sørensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, Hagen CP, Mogensen SS, Juul A. Recent secular trends in pubertal timing: implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. *Horm Res Paediatr* 2012;77:137-45
22. Kaplowitz PB. Link between body fat and the timing of puberty. *Pediatrics* 2008;121:S208-S217
23. Biro FM, Huang B, Crawford PB *et al.* Pubertal correlates in black and white girls. *J Pediatr* 2006;148:234-40
24. Martí-Henneberg C, Vizmanos B. The duration of puberty in girls is related to the timing of its onset. *J Pediatr* 1997;131:618-21
25. Biro FM, McMahon RP, Striegel-Moore R *et al.* Impact of timing of pubertal maturation on growth in black and white female adolescents: The National Heart, Lung, and Blood Institute Growth and Health Study. *J Pediatr* 2001;138:636-43
26. Pantiotou S, Papadimitriou A, Douros K, Priftis K, Nicolaidou P, Fretzayas A. Maturation tempo differences in relation to the timing of the onset of puberty in girls. *Acta Paediatr* 2008;97:217-20

27. Ferrández A, Carrascosa A, Audí L, *et al.* Longitudinal pubertal growth according to age at pubertal growth spurt onset: data from a Spanish study including 458 children (223 boys and 235 girls). *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009;22:715-26
28. Cameron N. Assesment of maturation. In *Human and development*. Edited by: Cameron N. Academic Press, San Diego, Ca;2002:363-382
29. Morris DH, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Familial concordance for age at menarche: analyses from the Breakthrough Generations Study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2011;25:306-311
30. Ojeda SR, Dubay C, Lomniczi A *et al.* Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. *Mol Cell Endocrinol* 2010;324:3-11
31. Boyar R, Finkelstein J, Roffwarg H, Kapen S, Weitzman E, Hellman L. Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty. *N Engl J Med* 1972;287:582-586
32. Ojeda SR, Wheaton JE, McCann SM. The onset of puberty in female rat: changes in plasma prolactin, gonadotropins, luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH), and hypothalamic LHRH content. *Endocrinology* 1976;98:630-638
33. Clayton RN. Role of GnRH in the maturation of pituitary gonadotroph function. *J Reprod Fertil* 1985;75:307-315
34. Dickerman Z, Prager-Lewis R, Laron Z. Response of plasma LH and FSH to synthetic LH-RH in children at various pubertal stages. *Am J Dis Child* 1976;130:634-638
35. Judge DM, Kulin HE, Santen R, Trapukdi S. Hypothalamic hamartoma: a source of luteinizing-hormone-releasing factor in precocious puberty. *N Engl J Med* 1977;296:7-10
36. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C *et al.* Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 2006;147:1166-74
37. Ojeda SR, Lomniczi A, Loche A, *et al.* The transcriptional control of female puberty. *Brain Res* 2010;1364:164-174
38. Ojeda SR, Lomniczi A. Puberty in 2013: unravelling the mystery of puberty. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10:67-69
39. Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 2008;29:48-69

40. Navarro VM, Tena-Sempere M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. *Nat Rev Endocrinol* 2011;8:40-53
41. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev* 2012;92:1235-316
42. Tena-Sempere M. Deciphering puberty: novel partners, novel mechanisms. *Eur J Endocrinol* 2012;167:733-747
43. Lomniczi A, Wright H, Ojeda SR. Epigenetic regulation of female puberty. *Front Neuroendocrinol* 2015;36:90-107
44. Dvornyk V, Waqar-ul-Haq. Genetics of age at menarche: asystematic review. *Human Reproduction Update* 2012;18:1986210
45. Tena-Sempere M. Keeping puberty on time: novel signals and mechanism involved. *Curr Top Dev Biol* 2013;105:299-329
46. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10972-6
47. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003;349:1614-27
48. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, *et al.* Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2012;366:629-35
49. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, *et al.* Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2276-80
50. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, *et al.* A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008;358:709-715
51. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006;147:5817-25
52. Bentsen AH, Ansel L, Simonneaux V, Tena-Sempere M, Juul A, Mikkelsen JD. Maturation of kisspeptinerigic neurons coincides with puberty onset in male rats. *Peptides* 2010;31:275-83
53. Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, *et al.* Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol* 2004;561:379-86

54. Plant TM, Ramaswamy S, Dipietro MJ. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 2006;147:1007-13
55. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2129-34
56. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, *et al.* Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 2006;257-258:75-83
57. Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, *et al.* Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 2010;151:722-30
58. Mayer C, Boehm U. Female reproductive maturation in the absence of kisspeptin/GPR54 signaling. *Nat Neurosci* 2011;14:704-10
59. Navarro VM, Bosch MA, León S, *et al.* The integrated hypothalamic tachykinin-kisspeptin system as a central coordinator for reproduction. *Endocrinology* 2015;156:627-37
60. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, *et al.* TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009;41:354-8
61. Young J, Bouligand J, Francou B, *et al.* TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2287-95
62. Yang JJ, Caligioni CS, Chan YM, Seminara SB. Uncovering novel reproductive defects in neurokinin B receptor null mice: closing the gap between mice and men. *Endocrinology* 2012;153:1498-508
63. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 2009;29:11859-66
64. Billings HJ, Connors JM, Altman SN, *et al.* Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 2010;151:3836-46

65. García-Galiano D, van IngenSchenau D, Leon S, *et al.* Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. *Endocrinology* 2012;153:316-28
66. Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, *et al.* Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E202-10
67. Ramaswamy S, Seminara SB, Ali B, Ciofi P, Amin NA, Plant TM.. Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macacamulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 2010;151:4494-503
68. Navarro VM, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, *et al.* Role of neurokinin B in the control of female puberty and its modulation by metabolic status. *J Neurosci* 2012;32:2388-97
69. Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, *et al.* Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* 2011;152:4265-75
70. Kinsey-Jones JS, Grachev P, Li XF, *et al.* The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat. *Endocrinology* 2012;153:307-15
71. Sandoval-Guzmán T, Rance NE. Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Re* 2004;1026:307-12
72. Sims RJ, Reinberg D. Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications?. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:815-20.
73. Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, *et al.* Epigenetic control of female puberty. *Nat Neurosci* 2013;16:281-9
74. Owen BM, Bookout AL, Ding X, *et al.* FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction. *Nat Med* 2013;19:1153-6
75. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, *et al.* Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med* 2013;368:2467-75
76. Elks CE, Perry JR, Sulem P, *et al.* Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet* 2010;42:1077-85
77. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell* 2008;32:276-84
78. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 2008 ;320:97-100

79. Frisch RE, Revelle R. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* 1970; 169: 397-9
80. Frisch RE. Body fat, menarche, fitness and fertility. *Hum Reprod* 1987;2:521-33
81. Martos-Moreno GA, Chowen JA, Argente J. Metabolic signals in human puberty: effects of over and undernutrition. *Mol Cell Endocrinol* 2010;324:70-81
82. Comninou AN, Jayasena CN, Dhillon WS. The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction. *Hum Reprod Update* 2014;20:153-74
83. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. *Horm Behav* 2013;64:187-94
84. Serra-Majem L, Aranceta Bartrina J, Pérez-Rodrigo C, Ribas-Barba L, Delgado-Rubio A. Prevalence and determinants of obesity in Spanish Children and young people. *Br J Nutr* 2006;96:S67-72
85. Muñoz MT, Argente J. Anorexia nervosa in female adolescents: endocrine and bone mineral density disturbances. *Eur J Endocrinol* 2002;147:275-86
86. Freedman DS, Wang J, Maynard LM, *et al.* Relation of BMI to fat and fat-free mass among children and adolescents. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:1-8.
87. Biro FM, Greenspan LC, Galvez MP, *et al.* Onset of breast development in a longitudinal cohort. *Pediatrics* 2013; 132: 1019-27
88. Bralic I, Tahirovic H, Matanic D, *et al.* Association of early menarche age and overweight/obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012; 25: 57-62.
89. Luciano AP, Benedet J, de Abreu LC, *et al.* Median age at stages of sexual maturity and excess weight in school children. *Reprod Health* 2013; 10: 56
90. Kaplowitz PB, Slora EJ, Wasserman RC, Pedlow SE, Herman-Giddens ME. Earlier onset of puberty in girls: relation to increased body mass index and race. *Pediatrics* 2001;108:347-53.
91. Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. Relation of age at menarche to race, time period, and anthropometric dimensions: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 2002;110:e43.
92. Mouritsen A, Aksglaede L, Soerensen K, *et al.* The pubertal transition in 179 healthy Danish children: associations between pubarche, adrenarche, gonarche, and body composition. *Eur J Endocrinol* 2013; 168: 129-36
93. Davison KK, Susman EJ, Birch LL. Percent body fat at age 5 predicts earlier pubertal development among girls at age 9. *Pediatrics* 2003; 111: 815-21.

94. Lee JM, Appugliese D, Kaciroti N, Corwyn RF, Bradley RH, Lumeng JC. Weight Status in Young Girls and the Onset of Puberty. *Pediatrics* 2007; 119; e624-30.
95. Oh CM, Oh IH, Choi KS, Choe BK, Yoon TY, Choi JM. Relationship Between Body Mass Index and Early Menarche of Adolescent Girls in Seoul. *J Prev Med Public Health* 2012; 45: 227-34
96. He Q, Karlberg J. BMI in childhood and its association with height gain, timing of puberty and final height. *Pediatr Res* 2001; 49: 244-51.
97. Leitão RB, Rodriques LP, Neves L, Arvalho GS. Development of adiposity, obesity and age at menarche: a 8-year follow-up study in Portuguese schoolgirls. *Int J Adolesc Med Health* 2013; 25: 55-63
98. Warren MP. Effects of undernutrition on reproductive function in the human. *Endocr Rev* 1983; 4: 363-77
99. Donoso MA, Muñoz-Calvo MT, Barrios V, Garrido G, Hawkins F, Argente J. Increased circulating adiponectin levels and decreased leptin/soluble leptin receptor ratio throughout puberty in female ballet dancers: association with body composition and the delay in puberty. *Eur J Endocrinol* 2010; 162: 905-11
100. Ibañez L, Ferrer A, Marcos MV, Hierro FR, de Zegher F. Early puberty: rapid progression and reduced final height in girls with low birth weight. *Pediatrics* 2000; 106: E72
101. Sloboda DM, Hart R, Doherty DA, Pennell CE, Hickey M. Age at menarche: influences of prenatal and postnatal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 46-50
102. Hernández MI, Martínez-Aguayo A, Cavada G, *et al.* Accelerated early pubertal progression, ovarian morphology, and ovarian function in prospectively followed low birth weight (LBW) girls. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2013; 26: 223-30
103. Ankarberg-Lindgren C, Dahlgren J, Carlsson B, *et al.* Leptin levels show diurnal variation throughout puberty in healthy children, and follow a gender-specific pattern. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 43-51
104. Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 10434-9
105. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1: 1155-61

106. Argente J, Barrios V, Chowen JA, Sinha MK, Considine RV. Leptin plasma levels in healthy Spanish children and adolescents, children with obesity, and adolescents with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J Pediatr* 1997;131:833-8
107. Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4162-5
108. Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005;19:525-46
109. Kratzsch J, Lammert A, Bottner A, *et al.* Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4587-94
110. Martos-Moreno GA, Barrios V, Argente J. Normative data for adiponectin, resistin, interleukin 6, and leptin/receptor ratio in a healthy Spanish pediatric population: relationship with sex steroids. *Eur J Endocrinol* 2006;155:429-34
111. Sone M, Osamura RY. Leptin and the pituitary. *Pituitary* 2001;4:15-23
112. Ahima RS. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:307-13
113. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, *et al.* Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;387:903-8.
114. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, *et al.* A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392:398-401
115. Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY, Spies HG, Clifton DK, Steiner RA. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 1998;139:4652-62
116. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 1999;60:216-2
117. Håkansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 1998;18:559-72
118. Quenell JH, Mulligan AC, Tups A, *et al.* Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 2009;150:2805-12
119. De Bond JA, Smith JT. Kisspeptin and energy balance in reproduction. *Reproduction* 2014;147:R53-63

120. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 2006;18:298-303
121. Backholer K, Smith JT, Rao A, *et al.* Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 2010;151:2233-43
122. Luque RM, Kineman RD, Tena-Sempere M. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* 2007;148:4601-11
123. Castellano JM, Roa J, Luque RM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides* 2009;30:139-45
124. Louis GW, Greenwald-Yarnell M, Phillips R, Coolen LM, Lehman MN, Myers MG Jr. Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis. *Endocrinology* 2011;152:2302-10
125. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, *et al.* Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 2005;146:3917-25
126. Jayasena CN¹, Nijher GM, Chaudhri OB, *et al.* Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4315-23
127. Tortoriello DV, McMinn J, Chua SC. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology* 2004;145:1238-47
128. Quennell JH, Howell CS, Roa J, Augustine RA, Grattan DR, Anderson GM. Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. *Endocrinology* 2011;152:1541-50
129. Castellano JM, Bentsen AH, Sánchez-Garrido MA, *et al.* Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. *Endocrinology* 2011;152:3396-408
130. Donato J, Cravo RM, Frazão R, *et al.* Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest* 2011;121:355-68

131. Donato J, Silva RJ, Sita LV, *et al.* The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. *J Neurosci* 2009;29:5240-50
132. Donato J Jr, Lee C, Ratra DV, Franci CR, Canteras NS, Elias CF. Lesions of the ventral premammillary nucleus disrupt the dynamic changes in Kiss1 and GnRH expression characteristic of the proestrus-estrus transition. *Neuroscience* 2013;25;241:67-79
133. Roa J, Tena-Sempere M. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:519-28
134. Castro-González D, Fuente-Martín E, Sánchez-Garrido MS, *et al.* Increased Prepubertal Body Weight Enhances Leptin Sensitivity in Proopiomelanocortin and Neuropeptide Y Neurons Prior to Puberty Onset in Female Rats. *Endocrinology* 2015;156:1272-82
135. Mela V, Díaz F, Lopez-Rodriguez AB, *et al.* Blockage of the neonatal leptin surge affects the gene expression of growth factors, glial proteins and neuropeptides involved in the control of metabolism and reproduction in peri-pubertal male and female rats. *Endocrinology* 2015;en20141981. [Epub ahead of print]
136. Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, *et al.* Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 2007;356:237-47
137. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, *et al.* Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 1999;341:879-84
138. Ellis KJ, Nicolson M. Leptin levels and body fatness in children: effects of gender, ethnicity, and sexual development. *Pediatr Res* 1997;42:484-8
139. Matsuda J, Yokota I, Iida M, *et al.* Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1642-4
140. Clayton PE, Gill MS, Hall CM, Tillmann V, Whatmore AJ, Price DA. Serum leptin through childhood and adolescence. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:727-33.
141. Quinton ND, Smith RF, Clayton PE, *et al.* Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2336-41
142. Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2849-55

143. Ahmed ML, Ong KK, Morrell DJ, *et al.* Longitudinal study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:899-905
144. Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, *et al.* Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3239-45
145. Chan JL, Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet* 2005;366:74-85
146. Ballauff A, Ziegler A, Emons G, *et al.* Serum leptin and gonadotropin levels in patients with anorexia nervosa during weight gain. *Mol Psychiatry* 1999;4:71-5
147. Misra M, Miller KK, Almazan C, *et al.* Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3486-95
148. de Alvaro MT, Muñoz-Calvo MT, Barrios V, *et al.* Regional fat distribution in adolescents with anorexia nervosa: effect of duration of malnutrition and weight recovery. *Eur J Endocrinol* 2007;157:473-9
149. Audi L, Mantzoros CS, Vidal-Puig A, Vargas D, Gussinye M, Carrascosa A. Leptin in relation to resumption of menses in women with anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 1998;3:544-7
150. Muñoz MT, de la Piedra C, Barrios V, Garrido G, Argente J. Changes in bone density and bone markers in rhythmic gymnasts and ballet dancers: implications for puberty and leptin levels. *Eur J Endocrinol* 2004;151:491-6
151. Welt CK, Chan JL, Bullen J, *et al.* Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 2004;351:987-97
152. Norman RJ, Clark AM. Obesity and reproductive disorders: a review. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:55-63
153. Yura S, Ogawa Y, Sagawa N, *et al.* Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin. *J Clin Invest* 2000;105:749-55
154. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:286-9

155. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, *et al.* Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3815-9
156. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, *et al.* Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2002;51:2734-41
157. Gil-Campos M, Cañete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* 2004;23:963-74
158. Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10308-13
159. Böttner A, Kratzsch J, Müller G, *et al.* Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4053-6
160. Casazza K, Hanks LJ, Alvarez JA. Role of various cytokines and growth factors in pubertal development. *Med Sport Sci* 2010; 55:14-31
161. Simpson KA, Singh MA. Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. *Obesity* 2008;16:241-256
162. Psilopanagioti A, Papadaki H, Kranioti EF, Alexandrides TK, Varakis JN. Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology* 2009;89:38-47
163. Lanfranco F, Zitzmann M, Simoni M, Nieschlag E. Serum adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:500-7
164. Modan-Moses D, Stein D, Pariente C, *et al.* Modulation of adiponectin and leptin during refeeding of female anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1843-7
165. Wen JP, Lv WS, Yang J, *et al.* Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371:756-61
166. Cheng XB, Wen JP, Yang J, Yang Y, Ning G, Li XY. GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine* 2011;39:6-12

167. Wen JP, Liu C, Bi WK, *et al.* Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *J Endocrinol* 2012;214:177-89
168. Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, *et al.* Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology* 2007;148:401-10
169. Lu M, Tang Q, Olefsky JM, Mellon PL, Webster NJ. Adiponectin activates adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreases luteinizing hormone secretion in LbetaT2 gonadotropes. *Mol Endocrinol* 2008;22:760-71
170. Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, *et al.* International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev* 2005;57:541-6
171. Date Y, Kojima M, Hosoda H, *et al.* Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141:4255-61
172. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, *et al.* The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2988
173. Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm* 2008;77:285-300
174. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-60
175. Sun Y, Asnicar M, Smith RG. Central and peripheral roles of ghrelin on glucose homeostasis. *Neuroendocrinology* 2007;86:215-28
176. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001;409:194-8
177. Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, *et al.* Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 2004;145:2607-12
178. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, *et al.* Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5992
179. Fernandez-Fernandez R, Aguilar E, Tena-Sempere M, Pinilla L. Effects of polypeptide YY(3-36) upon luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropin secretion in prepubertal rats: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* 2005;146:1403-10

180. Martini AC, Fernández-Fernández R, Tovar S, *et al.* Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology* 2006;147:2374-82
181. Roa J, Garcia-Galiano D, Varela L, *et al.* The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology* 2009;150:5016-26
182. Soriano-Guillén L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood, relationship with endocrine and metabolic and anthropometrics measures. *J Pediatr* 2004;144:30-35
183. Lebenthal Y, Gat-Yablonski G, ShtaiFB, Padoa A, Phillip M, Lazar L. Effect of sex hormone administration on circulating ghrelin levels in peripubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:328-31
184. Lanfranco F, Bonelli L, Baldi M, Me E, Broglio F, Ghigo E. Acylated ghrelin inhibits spontaneous luteinizing hormone pulsatility and responsiveness to naloxone but not that to gonadotropin-releasing hormone in young men: evidence for a central inhibitory action of ghrelin on the gonadal axis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3633-9
185. Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, *et al.* Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:879-87
186. Viani I, Vottero A, Tassi F, *et al.* Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1476-81
187. Cummings DE1, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50:1714-9
188. Liu J, Prudom CE, Nass R, *et al.* Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1980-7
189. Whatmore AJ, Hall CM, Jones J, Westwood M, Clayton PE. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;59:649-54
190. Soriano-Guillén L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 2004;144:36-42

191. Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5747-52
192. Fagerberg B, Hultén LM, Hulthe J. Plasma ghrelin, body fat, insulin resistance, and smoking in clinically healthy men: the atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism* 2003;52:1460-3
193. Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, *et al.* Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:109-16
194. Schneider LF, Monaco SE, Warren MP. Elevated ghrelin level in women of normal weight with amenorrhea is related to disordered eating. *FertilSteril* 2008;90:121-8
195. De Souza MJ, Leidy HJ, O'Donnell E, Lasley B, Williams NI. Fasting ghrelin levels in physically active women: relationship with menstrual disturbances and metabolic hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3536-42
196. Greenman Y, Rouach V, Limor R, Gilad S, Stern N. Testosterone is a strong correlate of ghrelin levels in men and postmenopausal women. *Neuroendocrinology* 2009;89:79-85
197. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 1992;13:387-414
198. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol.* 2004;490:5-12
199. Orosco M, Gerozissis K, Rouch C, Meile MJ, Nicolaïdis S. Hypothalamic monoamines and insulin in relation to feeding in the genetically obese Zucker rat as revealed by microdialysis. *Obes Res* 1995;3:655S-665S
200. Park MJ, Kim HS, Kang JH, Kim DH, Chung CY. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, free IGF-I, IGF binding protein (IGFBP)-1, IGFBP-3 and insulin in obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12:139-44
201. Korek E, Krauss H, Gibas-Dorna M, Kupsz J, Pi tek M, Pi tek J. Fasting and postprandial levels of ghrelin, leptin and insulin in lean, obese and anorexic subjects. *Prz Gastroenterol* 2013;8:383-9
202. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, *et al.* Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000;289:2122-5

203. Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2006;147:816-26
204. Divall SA, Williams TR, Carver SE, *et al.* Divergent roles of growth factors in the GnRH regulation of puberty in mice. *J Clin Invest* 2010;120:2900-9
205. Hill JW, Elias CF, Fukuda M, *et al.* Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab* 2010;11:286-97
206. Sato I, Arima H, Ozaki N, *et al.* Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems. *J Neurosci* 2005;25:8657-64
207. Szymanski LA, Schneider JE, Friedman MI, *et al.* Changes in insulin, glucose and ketone bodies, but not leptin or body fat content precede restoration of luteinising hormone secretion in ewes. *J Neuroendocrinol* 2007;19:449-60
208. Qiu X, Dowling AR, Marino JS, *et al.* Delayed puberty but normal fertility in mice with selective deletion of insulin receptors from Kiss1 cells. *Endocrinology* 2013;154:1337-48
209. Castellano JM, Navarro VM, Fernández-Fernández R, *et al.* Expression of hypothalamic KiSS-1 system and rescue of defective gonadotropic responses by kisspeptin in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Diabetes* 2006;55:2602-10
210. Moret M, Stettler R, Rodieux F, *et al.* Insulin modulation of luteinizing hormone secretion in normal female volunteers and lean polycystic ovary syndrome patients. *Neuroendocrinology* 2009;89:131-9
211. Patel K, Coffler MS, Dahan MH, *et al.* Increased luteinizing hormone secretion in women with polycystic ovary syndrome is unaltered by prolonged insulin infusion. *Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5456-61
212. Boden G, Chen X, Kolaczynski JW, Polansky M. Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest* 1997;100:1107-13
213. Burcelin R, Thorens B, Glauser M, Gaillard RC, Pralong FP. Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. *Endocrinology* 2003;144:4484-91
214. Koch C, Augustine RA, Steger J, *et al.* Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. *J Neurosci* 2010;30:16180-7

215. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, *et al.* Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3997-4000
216. Rodríguez Artalejo F, Garcés C, Gil A, *et al.* The 4 Provinces Study: its principal objectives and design. The Researchers of the 4 Provinces Study. *Rev Esp Cardiol* 1999;52:319-26.
217. Garcés C, de Oya M, investigadores del estudio Cuatro Provincias. Cardiovascular risk factors in children. Main findings of the For Provinces Study. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:517-24
218. Carrascosa Lezcano A, Fernandez Garcia JM, Fernandez Ramos C, *et al.* Spanish cross-sectional growth study 2008. Part II. Height, weight and body mass index values from birth to adulthood. *An Pediatr (Barc)* 2008; 68: 552-69
219. Caiza Sánchez ME, DíazRosellóJL, Simini F. Ponderal index to describe a term neonatal population. *An Pediatr (Barc)* 2003;59:48-53
220. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320: 1240-3
221. Fernández JR, Redden DT, Pietrobell A, Allison DB. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-Asian, and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004; 145: 439-44
222. Marco Hernández M, Benítez R, Medranda I, Pizarro C, Méndez MJ. Normal physiological variations of pubertal development: starting age of puberty, menarcheal age and size. *An Pediatr (Barc)* 2008;69:147-53
223. Daniels SR, Khoury PR, Morrison JA. The utility of body mass index as a measure of body fatness in children and adolescents: differences by race and gender. *Pediatrics* 1997;99:804-7
224. Wehkalampi K, Hovi P, Dunkel L, *et al.* Advanced Pubertal Growth Spurt in Subjects Born Preterm: The Helsinki Study of Very Low Birth Weight Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 525-33
225. Tam CS, de Zegher F, Garnett SP, Baur LA, Cowell CT. Opposing influences of prenatal and postnatal growth on the timing of menarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4369-73
226. Thankamony A, Ong KK, Ahmed ML, Ness AR, Holly JM, Dunger DB. Higher levels of IGF-I and adrenal androgens at age 8 years are associated with earlier age at menarche in girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E786-90

- 227. Rostami S, Kohan L, Mohammadianpanah M. The LEP G-2548A gene polymorphism is associated with age at menarche and breast cancer susceptibility. *Gene* 2015;557:154-7
- 228. Riestra P, Garcia-Anguila A, Torres-Cantero A, Bayonas MJ, de Oya M, Garces C. Association of the Q223R polymorphism with age at menarche in the leptin receptor gene in humans. *Biol Reprod* 2011;84:752-5
- 229. Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, et al. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology* 2010;151:1598-610

Anexo I. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica



INFORME DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACION CLINICA

TITULO DEL PROYECTO: "Análisis de la influencia de factores genéticos, nutricionales y perinatales sobre la edad de la menarquia".

Investigadores principales IIS-FJD: Dra. Carmen Garcés Segura y Dr. Leandro Soriano Guillén

El CEIC, en su reunión del 29 de enero de 2013 (Acta nº 01/13) ha evaluado y autorizado la solicitud para acceder a la base de datos de los niños que participaron en el Estudio 4P, con objeto de una vez obtenido un consentimiento verbal previo, recoger información sobre el periodo perinatal así como datos clínicos relacionados con la pubertad.

Consideramos que el Estudio reúne las normas éticas estándar de nuestra Institución para experimentación en el hombre, y que éstas a su vez coinciden con las de la Declaración de Helsinki de 1964, posteriores revisiones de Tokio (1975), Venecia (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996), Edimburgo (2000) y la última edición de Seúl (2008).

Asimismo, hacemos constar que no existe contraprestación económica para el centro ni para el equipo investigador.



Anexo II. Publicaciones derivadas del estudio hasta la fecha

Gavela-Pérez T, Garcés C, Navarro-Sánchez P, López Villanueva L, Soriano-Guillén L. Earlier menarcheal age in Spanish girls is related with an increase in body mass index between pre-pubertal school age and adolescence. *Pediatr Obes* 2015; doi:10.1111/ijpo.277 [Epub ahead of print]

Teresa Gavela Pérez, Pilar Navarro, Leandro Soriano Guillén, Carmen Garcés. High prepubertal leptin levels are associated with earlier menarcheal age. *Pediatr Res* [Under review]

